



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

FACTORES DE SUSCEPTIBILIDAD GENETICA  
Y GENES DE RESPUESTA INMUNOLOGICA  
LIGADOS AL MHC EN LA TUBERCULOSIS

T E S I S

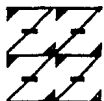
PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

NORMA BAUTISTA MATIAS

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUBIERO EN  
DE NUESTRA REGION

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE 1993.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

I.	RESUMEN	10 - 11
II.	INTRODUCCION	12 - 59
	1.- ASPECTOS CLINICOS DE LA TUBERCULOSIS	12 - 20
	2.- CARACTERISTICAS DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20 - 24
	3.- ASPECTOS INMUNOLOGICOS	25 - 28
	4.- ESPECIFICIDAD INMUNOLOGICA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR	28 - 29
	5.- COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD	30 - 59
	5.1).- LOCALIZACION	30 - 33
	5.2).- ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS MOLECULAS DEL MHC	34 - 45
	6.- ASOCIACION HLA Y ENFERMEDADES	46 - 49
	7.- MECANISMOS DE ASOCIACION HLA	46 - 55
	7.1).- HIPOTESIS DE RECEPTORES	40 - 50
	7.2).- MIMETISMO MOLECULAR	50 - 51
	7.3).- INTERACCION DE LAS MOLECULAS HLA CON LIGANDOS NO INMUNOLOGICOS	51
	7.4).- MODIFICACION VIRAL DE LOS ANTIGENOS PROPIOS	51
	7.5).- GENES QUE ESTAN ESTRECHAMENTE LIGADOS CON EL COMPLEJO HLA.	52
	7.6).- GENES DE RESPUESTA INMUNOLOGICA	53
	7.7).- GENES METABOLICOS	53
	7.8).- MECANISMOS MOLECULARES DE ASOCIACION EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES	54 - 55
	8.- PARTICIPACION DE FACTORES GENETICOS EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR	56 - 59

III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	60
IV.	HIPOTESIS	60
V.	OBJETIVOS	61 - 62
VI.	MATERIALES Y EQUIPO	63 - 65
	a).- MATERIAL	
	b).- EQUIPO	
	c).- REACTIVOS	
VII.	METODOS	66 - 78
	1.- TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA CLASE I (A,B,C) Y CLASE II (DR y DQ)	
	1.1).- SEPARACION DE CELULAS MONONUCLEARES CON SOLUCION DE FICOLL-HIPAQUE	
	1.2).- PURIFICACION DE LOS LINFOCITOS T y B POR COLUMNA DE NYLON	
	1.3).- PREPARACION DE LAS MICROPLACAS PARA TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA	
	1.4).- TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA MEDIANTE LA TECNICA DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD	
	2.- MICROCULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES PARA LA PRUEBA DE TRANSFORMACION BLASTOIDE	
	3.- ANALISIS ESTADISTICO	
VIII.	RESULTADOS	79 - 94
IX.	DISCUSION	95 - 103
X.	CONCLUSIONES	104 - 105
XI.	BIBLIOGRAFIA	106 - 115

#### ABREVIATURAS

HLA= Antígenos de Leucocitos Humanos  
MHC= Complejo Principal de Histocompatibilidad  
TB= Tuberculosis  
TBP= Tuberculosis pulmonar  
ALA= American Lung Association  
UU= No reactivos  
UI= No-reactivos intermedios  
RI= Reactivos intermedios  
RR= Reactivos  
TT= Lepra tuberculoide polar  
BT= Lepra dimorfa tuberculoide  
BL= Lepra dimorfa lepromatosa  
LL= Lepra lepromatosa polar  
PPD= Derivado Proteico Purificado  
PHA= Fitohemaglutinina  
FP= Fracción preventiva  
FE= Fracción etiológica  
Is= Gen de supresión inmunológica  
Ir= Gen de respuesta inmunológica  
M. tuberculosis= Mycobacterium tuberculosis  
M. bovis= Mycobacterium bovis  
M. leprae= Mycobacterium leprae  
BCG= Bacilo Calmette Guérin  
IL-1= Interleucina 1  
IL-2= Interleucina 2  
IL-6= Interleucina 6

RIC= Respuesta inmunológica celular

Fc= Región de la molécula de las inmunoglobulinas responsables de la unión de ésta con los receptores para inmunoglobulinas de las células y con el componente C1q del complemento.

IgG= Inmunoglobulina G

Tc= Linfocitos T citotóxicos

TCR= Receptor de células T

CML= Cultivo de Mezcla de Linfocitos

RFLPs= Fragmentos de restricción de longitud variable

PCR= Reacción en cadena de la polimera

ARA= Atritis reumatoide de adulto

STF= Suero de ternera fetal

R= Coeficiente de correlación

## I. RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica que constituye un grave problema de salud pública en México. La susceptibilidad a la enfermedad se asocia a factores sociales, culturales, económicos, de hacinamiento, políticos, la edad, el sexo, la raza y la localización geográfica. La predisposición genética ligada a HLA ha sido sugerida en otras poblaciones y este es el primer estudio en mexicanos que demuestra claramente la participación del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) en la expresión del padecimiento. Se seleccionaron 100 pacientes diagnosticados con tuberculosis pulmonar tipo III(Tb) por neumólogos expertos del Servicio de Neumología del Hospital General de México de acuerdo a los criterios de la ALA: 18% son UU, 38% UI, 42% son RI y el 2% son RR. La edad promedio es de  $X=39.1$  años y el 43% son mujeres. No parece haber preferencia de edad o sexo en la tuberculosis pulmonar. Se tipificaron antígenos clase I (HLA-A,B,C) y clase II (HLA-DR,DQ,DP) por las técnicas de microlinfocitotoxicidad sobre linfocitos T y B respectivamente utilizando aloantisueros y anticuerpos monoclonales del Banco de Sueros del Departamento de Inmunogenética. También se exploró la respuesta inmunológica celular in vivo aplicando intradérmicamente 5 U de PPD e in vitro mediante transformación blastoide utilizando como mitógeno a la PHA y como antígeno específico el PPD. No existe participación alguna de los genes clase I ni de los DQ y DP de clase II en la predisposición genética a la enfermedad. Es evidente un incremento del HLA-DR<sub>2</sub> sin participación de ningún subtipo (DR15 o DR16) (DR15 con una  $X = 3.56$ ,  $p = 0.05$ ). La asociación del DR2

es más intensa en la forma UU ( $X^2 = 4.3$ ,  $p=0.02$ ,  $RR=3.4$ ) y en los UI ( $X^2 = 5.2$ ,  $p=0.01$ ,  $RR= 2.8$ ) lo que sugiere que la severidad depende del DR2. También existe un gen de protección fuertemente asociado a DR11 ( $X^2 = 12.8$ ,  $p=0.0003$ ,  $RR=0.2$ ). La ausencia de éste se intensifica en el grupo UI ( $X^2 = 6.7$ ,  $p=0.009$ ,  $RR=0$ ) hasta ser total en los UU. La fracción etiológica de 0.22 en los pacientes totales y de 0.18, 0.25 y 0.31 en los RI, UI y UU respectivamente indica que el DR2 contribuye parcialmente a la expresión de la enfermedad, y que se requiere de otros factores para que sinérgicamente se manifieste. La FP de 1.00 en los UU indica que la protección dada por el DR11 es total y que si un individuo manifiesta la tuberculosis pulmonar y no es portador del DR11 probablemente desarrollará la forma más severa. La falla en la capacidad de respuesta inmunológica celular al antígeno específico, depende de un gen Is que está ligado al DR2, pues el 56% de los pacientes PPD- son DR2+ ( $X^2 = 7.28$ ). Se concluye que el gen de susceptibilidad localizado en la región DR (DR2) es el mismo que opera como gen Is y no permite la respuesta adecuada al antígeno específico, dejando susceptible al individuo que se expone a la infección a que manifieste la enfermedad.



## II. INTRODUCCION

### 1.- ASPECTOS CLINICOS DE LA TUBERCULOSIS (TB)

La TB es una enfermedad infecciosa crónica producida por una micobacteria que constituye un grave problema de salud pública en los países en vías de desarrollo.

Probablemente la especie humana estuvo en contacto con algunas micobacterias desde tiempos ancestrales pero, en algún momento estos organismos saprófitos se convirtieron en parásitos capaces de provocar enfermedades en los organismos más susceptibles. Debido a que la población humana era escasa, dispersa y aislada con una estructura social incipiente, se piensa que la enfermedad tuvo que haber tenido una transmisión mínima. Cuando el hombre estableció comunidades fijas, la infección y la enfermedad adquirieron una mayor frecuencia, como se observa en los restos humanos muy antiguos. La susceptibilidad a la enfermedad se asocia fundamentalmente a factores sociales, culturales, económicos, de hacinamiento, y políticos (1). Sin embargo, la TB no está uniformemente distribuida y los casos dependen de la raza y localización geográfica.

Se ha observado que algunas personas presentan una reacción de hipersensibilidad tardía al PPD específicamente en áreas con climas tropicales (2) lo cual sugiere que las características del huésped son fundamentales en cuanto a la capacidad que tiene cada individuo para responder a los antígenos de la micobacteria. La TB se transmite en todos los grupos humanos, pero hay poblaciones que muestran una resistencia innata a la infección con M. tuberculosis. Así, los negros americanos y ciertas tribus

africanas son particularmente susceptibles a la tuberculosis, mientras que los judíos europeos son relativamente resistentes (1), lo mismo que los orientales quienes muestran una resistencia natural a la enfermedad (3).

El género de las micobacterias está formado por unas 40 especies (4) que incluyen además del bacilo causante de la TB, a la bacteria responsable de la lepra. Estas dos infecciones han sido quizás las que más daño han causado al hombre a lo largo de la historia (5). Las dos especies del bacilo tuberculoso que infectan al hombre son: M. tuberculosis y M. bovis.

En algunos países como en los Estados Unidos, los programas de erradicación de la tuberculosis bovina han sido tan efectivos que actualmente la enfermedad sólo aparece esporádicamente (3). En Canadá, Estados Unidos y Cuba el problema de la TB es mínimo debido a que los casos que se presentan son de grupos sociales marginados y de trabajadores migratorios, y existe un sistema muy efectivo de identificación. La mortalidad ocasionada por esta enfermedad en Canadá es de 1/10,000 habitantes (1), y en Estados Unidos ha disminuido constantemente durante los últimos 70 años. Allí, la TB ha dejado de ser la causa principal de muerte, ya que en 1980 se registraron sólo 1.5 defunciones por cada 100,000 habitantes, pero los informes preliminares indican que el número de nuevos casos en 1981 excedió al de 1980, debido al número importante de refugiados indochinos infectados que han ido llegando a los Estados Unidos (3). En México la incidencia es bastante alta, ya que en 1972 se notificaron 17,766 casos y en 1982 disminuyó a 8,265 el índice de mortalidad informado fue de 7.9/10,000 habitantes en todas las formas de TB. En 1988 se

informaron 16,573 casos incluyendo adultos, jóvenes y niños (1, 6). En 1990 se registraron 115 casos sólo de tuberculosis meningea en todo el país, por lo que la enfermedad sigue siendo un problema de salud pública (7).

La tuberculosis es una infección bacteriana necrosante con sintomatología muy variada y distribución mundial. En el hombre, los órganos más afectados son los pulmones, pero también pueden lesionarse los riñones, los huesos, los ganglios linfáticos y las meninges, o puede diseminarse por todo el organismo. La enfermedad es causada por bacilos aerobios estrictos y prosperan mejor cuando existe una presión de oxígeno de 140 mm. Hg. Los órganos comúnmente afectados por el M. tuberculosis son los que tienen una tensión alta de oxígeno. Los focos metastásicos son más frecuentes en los vértices pulmonares, en donde la presión varía entre 120 y 130 mm de Hg en posición erecta. Le sigue el riñón y el extremo de los huesos, en donde hay una presión de 100 mm Hg. En el hígado y en el bazo existe una presión bastante baja por lo que rara vez se ven afectados, excepto en las infecciones diseminadas (3).

La transmisión de la enfermedad puede ser el resultado de la progresión de una infección reciente o el recrudecimiento de una infección latente. En la TB primaria abundan los bacilos tuberculosos que se excretan en gotitas durante la tos, el estornudo y al hablar; también están en el material caseoso licuado de una cavidad. Al ser inhaladas las pequeñas gotitas son atrapadas por la cubierta mucociliar y se expulsan del pulmón sin ningún dano, pero las de menor tamaño pueden llegar a los bronquios y depositar los bacilos fuera del alcance de la

protección mucociliar. En ese sitio los microorganismos pueden invadir a los tejidos y establecer una infección en el huésped susceptible. Las personas que han sufrido una infección previa están protegidas de la reinfección debido a la inmunidad específica celular, cuyos efectores son los linfocitos T que reconocen específicamente al bacilo (5, 8).

La diseminación del bacilo a otros tejidos del organismo a partir del órgano o tejido infectado inicialmente, va desde el sitio de entrada a la vía linfática, que provoca una reacción en los ganglios linfáticos la cual recibe el nombre de complejo primario, diseminándose a otros órganos en pocas horas (3, 9).

Las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad en el hombre son los nódulos granulomatosos, que aparecen en el sitio de la infección, los cuales cicatrizan al tiempo que se hace positiva la reacción de la respuesta al PPD demostrándose así la presencia de inmunidad específica. Cuando las lesiones pulmonares se empiezan a distribuir en la periferia del órgano y al mismo tiempo se extienden a los ganglios hiliares se denomina Complejo primario de Ranke (5). Lo que ocurre es lo siguiente: las lesiones se reducen de tamaño hasta quedar pequeños nódulos que pueden calcificarse, o desaparecer por absorción u osificarse. Se denominan focos de Ghon los cuales se observan en las placas radiográficas (5, 9, 10, 11). Otras siguen rodeadas por fibrosis y sales de calcio que se depositan en los nódulos, pero si la lesión se calcifica puede ser absorbida completamente, persiste y poco después se osifica (11).

Cuando las lesiones no cicatrizan, el foco primario evoluciona de la siguiente manera: los centros caseosos aumentan y

se licúan. La descarga de este material provoca ulceraciones dentro de la cavidad pleural o se dirige por tres vías hacia otros sitios del organismo (3):

a.- La vía bronquial.- Afecta otras zonas pulmonares o por medio del esputo llega a la laringe y a las vías digestivas.

b.- A través del sistema linfático.- Cuando se disemina la infección por esta vía, ocasiona linfadenopatía regional y produce diseminación miliar a través del conducto linfático.

c.- La vía hemática.- Por medio de las venas pulmonares. El material infectado se disemina a los huesos, los riñones, las glándulas suprarrenales, el cerebro y las meninges.

Los términos de TBP y tuberculosis post-primaria son un tanto confusos. La tuberculosis primaria se refiere a personas que previamente no han tenido una primo-infección. La vacuna de BCG es una forma de inducción artificial de la tuberculosis primaria. La tuberculosis post-primaria o secundaria implica que el paciente ha sido previamente infectado por el organismo. Uno de los principales problemas en la definición de tuberculosis post-primaria es que no en cualquier individuo, es posible determinar si la enfermedad se debe a reactivación de un foco necrótico de infección, o a reinfección por organismos exógenos. Tanto la teoría endógena como la exógena tienen sus bases. La endógena implica que una infección primaria produce una resistencia alta y muy duradera. La teoría exógena rechaza el concepto de una inmunidad absoluta de por vida (12).

La inmunidad es inducida por la vacuna BCG y disminuye con el tiempo, pero también se induce en forma natural. La reinfección exógena puede ser producida por inhalación, retención

y multiplicación del bacilo tuberculoso en pacientes que fueron infectados previamente. La TB clínica se desarrolla después de una infección exógena que depende en parte de la virulencia de la micobacteria y de la resistencia adquirida del huésped. Handell y col. (citado en 4) proponen que los que se reinfectan son los que tiene cavernas y gran cantidad de bacilos en el esputo.

También existen factores que debilitan la condición del individuo como la desnutrición crónica que predispone a una enfermedad más severa, en los individuos reinfectados exógenamente (5, 12). Es probable que la forma endógena y exógena de la infección post-primaria ocurra porque la incidencia relativa de cada tipo de enfermedad está determinada por el número de casos infectados en una comunidad y la reinfección exógena ocurre muy raramente (4).

En la TBP post-primaria las lesiones se presentan frecuentemente en el ápice del lóbulo superior del pulmón. Dichas lesiones van acompañadas de un foco asmático, aumento y licuefacción de los centros caseosos presentes. Subsecuentemente la descarga de este material licuado dentro de los bronquios da como resultado la formación de cavidades y la diseminación de la infección por todo el pulmón. El desarrollo pleural en la post-primaria es raro a causa de los marcadores de adhesión y de la fibrosis. En contraste con la infección primaria, los ganglios linfáticos son mínimos, lo cual implica que se disemina muy rara vez por la vía linfática y sanguínea. Las lesiones secundarias, comunmente se manifiestan como pequeñas úlceras, que crecen por inoculación directa con el esputo infectado. Esta infección puede darse por la tráquea, la faringe, la boca, el

intestino delgado, el colon y el ano, pero la diseminación puede ser ocasionada por la ulceración de los focos cerebrales en el liquido cefalorraquídeo o por lesiones renales en el tracto urinario.

La inmunidad específica se desarrolla cuando el bacilo tuberculoso que penetra en los espacios aéreos distales del pulmón de una persona, es atrapado por un macrófago dentro de una vacuola fagocítica (fagosoma). El fagosoma puede fusionarse con un lisosoma formando el fagolisosoma y así el bacilo muere debido a la acción de las enzimas proteolíticas. Con o sin la muerte intracelular, el macrófago digiere y presenta a los antígenos micobacterianos a los receptores de los linfocitos T y secreta sustancias llamadas monocinas entre las que están la IL-1 y la IL-6 que activan a los linfocitos T. Los linfocitos T activados producen una gran variedad de linfocinas que incrementan la capacidad de lisis de los macrófagos activados. Algunos se transforman primero en células epitelioides y después en gigantes multinucleadas formando el granuloma capaz de matar a los bacilos tuberculosos ingeridos. Las enzimas proteolíticas liberadas por los macrófagos, células epitelioides y células gigantes producen la necrosis tisular llamada caseificación. En presencia de un gran número de bacilos, el tejido necrótico puede licuarse, permitiendo que la infección se propague a otras partes del pulmón (3, 9).

La infección inicial llamada "tuberculosis primaria" ocurre en sujetos no inmunizados en los que los bacilos pueden ingresar al organismo por las diversas vías ya mencionadas. La mayoría de las lesiones en la fase inicial de la infección se localizan en

los dos tercios inferiores de los pulmones, donde la ventilación es mejor y por lo tanto es más factible que se depositen los agentes de las gotitas infectantes.

Después que se efectúa la fagocitosis en el huésped no inmune, los bacilos pueden permanecer viables o multiplicarse dentro del macrófago durante un periodo de tiempo amplio. Los microorganismos llegan a los ganglios regionales (hiliares) e incluso a la sangre antes de que su progreso se inhiba por la adquisición gradual de inmunidad específica durante un periodo de varias semanas. Así se va desarrollando una reacción tisular con la formación del granuloma y la necrosis con caseificación en la lesión primaria, en los ganglios linfáticos regionales y en cualquier otro sitio a donde los bacilos se hayan diseminados.

La cantidad de bacilos baja en forma drástica con la aparición de necrosis caseosa, lo que indica que la caseificación se acompaña de la acción local de linfocinas liberada de los linfocitos T que se acumulan en el sitio de la infección y de enzimas liberadas por los macrófagos las cuales destruyen a los tejidos del huésped, lo mismo que los bacilos.

La infección en el sitio primario casi siempre sana por una combinación de resolución, fibrosis y calcificación. En ocasiones las defensas fallan y la infección puede abrumar al huésped o pasar a una etapa crónica, en la que puede ocurrir una diseminación silenciosa de los bacilos que llegan a todos los órganos. Durante esta etapa, con frecuencia se producen lesiones únicamente en los sitios limitados a una elevada tensión tisular de oxígeno. Probablemente por esta razón son los sitios en los cuales los bacilos viables persisten en un estado latente en



focos metastáticos y desencadenan una enfermedad clínica (3, 9).

## 2.- CARACTERISTICAS DE Mycobacterium tuberculosis

M. tuberculosis es un bacilo ácido-alcohol resistente que se presenta en forma de bacilos rectos y delgados y mide de 1 a 4 um de longitud y de 0.3 a 0.6 um de diámetro (4).

La bacteria causante de la tuberculosis en el humano es M. tuberculosis, la cual pertenece al género Mycobacterium. Este se divide en dos grandes grupos uno de crecimiento lento y otro de crecimiento rápido. Tsukamura M. (citado en 5) considera dos géneros denominados el Mycobacterium (lento crecimiento), al cual pertenece el bacilo que provoca la enfermedad y Mycomycobacterium (crecimiento rápido.) (4).

M. tuberculosis es un bacilos Gram-positivo y tienen la propiedad de resistir la decoloración por un ácido débil o por el alcohol y por eso se llaman bacilos ácido-alcohol resistentes (4, 5, 13). No poseen flagelo por lo que son inmóviles; no forman esporas y no producen verdaderas cápsulas aunque muchas especies producen secreciones extracelulares. Se reproduce por fisión binaria (4, 5).

Uno de los factores para considerar a M. tuberculosis como mesófilo estricto es que es un saprófito ambiental, el cual crece en un rango de 25 C-37 C(5). Se caracteriza por el alto contenido de lípidos en la pared celular, los cuales llevan a cabo funciones muy importantes en el bacilo y constituyen el 60 % del peso seco. Las micobacterias son probablemente las bacterias que presentan mayor proporción de lípidos. Estos son sus fuentes principales de carbono y energía. La abundancia sorprendente de

ellos en la pared celular explica el carácter hidrófobo de los organismos, que se muestra por su tendencia a agruparse durante el crecimiento en medios acuosos (4, 14).

La pared celular de M. tuberculosis, es una estructura compleja constituida por 4 capas. La capa más interna anexa a la pared celular, esta formada de muramina o peptidoglicano (4). La capa de muramina está constituida esencialmente por ácido murámico, N-glicolil y N-acetil glucosamida, los cuales se unen alternadamente en forma lineal, entrelazándose por pequeñas cadenas de aminoácidos que en el caso de M. leprae contienen alanina o glicina. Esta estructura se rompe por una enzima lizozómica y uno de los productos del rompimiento enzimático es el N-acetil-muramil-2-alanina-D-isoglutamina (MDP), que es un poderoso adyuvante para la inmunización con antígenos diversos en soluciones acuosas (5).

Después se halla una capa de arabino-galactosa y otra más al exterior de ácidos micólicos. La capa superficial contiene sulfolípidos, factor cuerda (identificado como un micósido 6,6'alfa dimicoliltrealosa) y micósidos (5, 14, 15).

El factor cuerda está constituido por dos ácidos micólicos unidos por el disacárido trialosa, responsable del crecimiento de cordones de la micobacteria (4, 5). Se considera como una sustancia tóxica que inhibe la migración de los leucocitos polimorfonucleares in vitro y estimula la formación del granuloma. Este factor contribuye probablemente de un modo sustancial a la acción patógena, y es responsable del desarrollo en serpiente semejante a una cuerda in vitro de M. tuberculosis.

La pared celular de la bacteria está compuesta de lípidos que pueden explicar la impermeabilidad relativa a las tinciones, la resistencia a la destrucción por ácidos y álcalis, la actividad bactericida del complemento y la digestión intracelular de este microorganismo por los macrófagos (5, 15, 16).

Los micósidos son glicolípidos o peptidoglicolípidos que varían de acuerdo a la especie de Mycobacterium. Se localizan en la superficie y juegan un papel importante en la morfología de las colonias. En algunos casos sirven como receptores de fagos y son los responsables de la seroaglutinación (5). En la pared celular se encuentra un alto contenido de lípidos en su mayor parte ácido micólico, que son responsables de la alta hidrofobicidad de las células y de la resistencia al ataque químico por enzimas líticas cuando la bacteria se encuentra dentro del hospedero. De esta cubierta lipoidal depende probablemente la impenetrabilidad de materiales a las células y la reproducción lenta de la micobacteria por la entrada restringida de material nutricional al organismo, en este caso el oxígeno (4).

Las fuentes esenciales para el crecimiento de las bacterias son el carbón, nitrógeno y metales esenciales que incluyen a los iones hierro y magnesio. La enorme cantidad de lípidos en la pared celular puede contribuir también a la lentitud del crecimiento tanto al dificultar el paso de sustancias nutritivas al interior de la célula, como al consumir gran parte de la capacidad biosintética de ésta. El carbono es la fuente de carbohidratos, (glucosa, glicerol y ácidos orgánicos, especialmente el ácido pirúvico). El nitrógeno suministra

amonio, aminoácidos y en algunos casos iones nitrito. El ácido aspártico es particularmente útil como fuente de nitrógeno (5, 15).

Intracelularmente, M. tuberculosis no difiere en estructura de otras bacterias; su material genético es una masa alargada en el centro de la célula sin estar limitado por una membrana y su citoplasma es similar al de otras bacterias (4, 5). En él se observan ribosomas, gotas de lípidos y gránulos constituidos por polifosfatos. Estas partículas corresponden a la metacromatina o cuerpos voluminosos observados en la corinebacteria que probablemente sirven como almacenadoras de energía (5).

Genéticamente carece de sensibilidad hacia las drogas antituberculosas, en comparación con otras especies que son más resistentes a ellas. Su virulencia del está asociada al efecto cidal del peróxido para producir enzimas catalizadoras. Este efecto es la resistencia que presentan algunas especies al peróxido de hidrógeno lo cual se ha demostrado en cepas mutantes de cobayos que son resistentes al ácido hidrácido isonicotínico en las que hay una baja actividad de la peroxidasa y las cepas son cada vez menos virulentas en comparación con la original. Por consiguiente el peróxido de hidrógeno es el agente bactericida intracelular más importante contra M. tuberculosis (4, 5).

La propiedad de funcionar como adyuvante, está dada como ya se mencionó, por los péptidos glicolípidos (cera D de alto peso molecular, que se extrae aparentemente de la capa basal de la pared celular), muramil dipéptido, sulfolípidos y el factor

cuerda. Esto parece tener un efecto mitogénico inespecífico sobre las células B y posiblemente también sobre los linfocitos T. La actividad adyuvante podría representar un sistema de reconocimiento primitivo, que ha conducido a la evolución del sistema inmunológico específico. En el hospedero infectado se manifiesta esta actividad adyuvante que podría ser la responsable de la síntesis y expresión de diversos tipos de autoanticuerpos (como son el factor antinuclear y el factor reumatoide) que comunmente se presentan en enfermedades micobacterianas (5, 16).

La estructura antigénica de las micobacterias consiste de por lo menos 30 antígenos distintos. Aunque algunos son específicos de especie, otros son comunes a diversas micobacterias, y probablemente dan lugar a una reactividad cruzada entre ellas. Los antígenos de la micobacteria abarcan a los solubles o citoplasmáticos y a los particulados o específicos.

Los antígenos citoplasmáticos se dividen en cuatro grupos principales: a) los que son comunes para todas las especies y algunos se relacionan con algún género en particular de bacterias; b) los antígenos que están relacionados con los subgéneros de lento crecimiento; c) los que se presentan en las especies de crecimiento rápido y también en los géneros Nocardia; d) los antígenos específicos de cada especie.

La respuesta inmunológica es una consecuencia del efecto de los antígenos sobre la regulación celular o humoral y los antígenos de superficie están involucrados en las reacciones de aglutinación (4, 5, 15).

### 3.- ASPECTOS INMUNOLOGICOS

La mayoría de las bacterias que logran penetrar al organismo son eliminadas mediante mecanismos inmunológicos humorales y celulares, es decir a través de respuestas específicas. En su fase efectora, la respuesta inmunológica se divide en dos tipos: una respuesta humoral que depende de los linfocitos B que al ser estimulados por el antígeno, se transforman en células plasmáticas secretoras de anticuerpos específicos contra el antígeno que indujo su síntesis. La respuesta inmunológica celular (RIC) dependiente de los linfocitos T y sus diversas subpoblaciones. La respuesta inmunológica, en contra de la micobacteria, consiste de interacciones muy complejas que pueden dar como resultado la protección del individuo, o conllevar al daño tisular asociado a la patología de la enfermedad. La inmunidad celular es la que se ocupa de la protección contra la TB. Si una persona sufre de TB post-primaria, quiere decir que la resistencia del huésped está afectada y que se ha reactivado un foco tuberculoso primario (2, 17, 18, 19). Hay muchas evidencias de que la RIC está alterada en estos casos (11, 19).

En la tuberculosis progresiva se puede observar un espectro inmunopatológico comparable al de la lepra. En un extremo una prueba cutánea positiva, con un RIC intacta o normal, títulos bajos de anticuerpos y pocos bacilos en los tejidos; en el otro extremo una enfermedad definida, diseminada lepromatosa o miliar no-reactiva en la que hay una RIC específica abatida con linfopenia de células T cooperadoras o CD4, con tendencia a tener anticuerpos específicos elevados y la presencia de un gran

número de bacilos en los tejidos. En medio de estas dos formas está una intermedia con dos subtipos que varían en sus manifestaciones clínicas e histopatológicas (2, 11, 18, 19). De esta clasificación se hablará en detalle más adelante.

Para saber si un sujeto ha estado en contacto con la micobacteria se hace una prueba intradérmica llamada prueba de Mantoux la cual consiste en la aplicación de 2, 5 y 10 U de Derivado de Proteína Purificado de la micobacteria (PPD). Si el sujeto presenta una induración de 10-15 mm de diámetro después de 48-72 horas de aplicada, la prueba se considera positiva, lo que significa ya sea protección en un individuo asintomático, o una infección activa. Si la induración es de 20 mm de diámetro o más significa que la bacteria está alojada en el organismo. Las personas que reaccionan poco o son anérgicas al PPD aunque hayan estado expuestas al bacilo son los sujetos que sufren de desnutrición o están inmunosuprimidos. Una prueba negativa indica que no hay infección tuberculosa, que el sujeto no ha estado en contacto con el bacilo o que padece una enfermedad diseminada y ha entrado en un estado anérgico debido a inmunosupresión (2, 20).

La anergia es específica y puede estar asociada como ya se mencionó con un aumento en los niveles de anticuerpos dirigidos contra la micobacteria. Cuando se administra tratamiento a un paciente anérgico, éste generalmente desarrolla hipersensibilidad retardada y los niveles de anticuerpos bajan (2, 11, 18, 20). Se ha visto que menos del 1% de los pacientes con TB pueden ser PPD negativos lo que sugiere que el polo severo es poco común. En climas tropicales las personas pueden desarrollar una

hipersensibilidad retardada contra otras micobacterias lo que puede ocasionar reactividad cruzada y a su vez puede causar falsas reacciones negativas o respuestas bajas al PPD (2). La mezcla de cera D y de proteínas de bacilo tuberculoso inducen una respuesta celular a la tuberculina, mientras que las proteínas solas son débilmente inmunogénicas (15).

Existe otro problema que es la "memoria" que provoca que aumente o que disminuya el tamaño de la reacción. Esta respuesta anamnésica puede crear confusión especialmente en áreas geográficas en donde no hay una reactividad cruzada o en quienes habitan en una zona de alta prevalencia y por lo tanto tienen un riesgo alto de ser infectados por M. tuberculosis. Puede haber pacientes tuberculosos que son PPD negativos, debido a que la TB se empieza a desarrollar o a que existen otras complicaciones como la anergia, la sarcoidosis, infecciones virales, la desnutrición, la edad avanzada, lesiones malignas, o el tratamiento con inmunosupresores o esteroides. Los pacientes anérgicos al PPD generalmente pueden responder a otros antígenos como ocurre con la lepra, la leishmaniasis visceral, o la coccidioidomicosis ya que la falla en la capacidad de respuesta es específica. En general, los pacientes que son anérgicos al PPD también lo son in vitro cuando se cultivan linfocitos con el antígeno específico. La anergia se observa al inicio de la enfermedad y va desapareciendo con el tiempo cuando el paciente está bajo tratamiento (2).

Los mecanismos específicos de supresión de la RIC son responsables de la depresión de la respuesta cutánea en la TB activa. También los complejos inmunes circulantes que



contienen polisacáridos micobacterianos como la D-arabinosa o D-galactosa (19) pueden causar inmunosupresión, por lo tanto este polisacárido suprime la respuesta linfocítica al PPD y a la PHA (5, 21). Otro de los mecanismos de supresión es la producción de prostaglandina E por los monocitos activados. Los pacientes tienen números elevados de monocitos supresores lo cual se asocia con la activación de monocitos que expresan en forma deficiente antígenos clase II HLA-DR y que producen cantidades elevadas de IL-1. Otro mecanismo paralelo consiste en la supresión específica por los linfocitos que tienen receptores para el fragmento Fc de la IgG. La consecuencia de estos circuitos inmunosupresores es la depresión de la blastogénesis de los linfocitos T, de la producción de IL-2 y de la síntesis de receptores para IL-2. (2, 18, 19).

#### 4.- ESPECTRO INMUNOLOGICO DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR

Aunque la protección inmunológica principal en las enfermedades micobacterianas es la debida a la RIC los anticuerpos son de utilidad para fines de diagnóstico.

Como ya se señaló la tuberculosis tiene un espectro tanto clínico como inmunológico similar al de la lepra, por lo que Turk (1971) propuso un esquema espectral equivalente complementado con el de Lenzini y col. (10) como se describe a continuación:

RR (Tuberculosis reactiva): La localización es micronodular. La respuesta cutánea al PPD es positiva. los linfocitos T responden in vitro al antígeno específico. Hay niveles bajos de anticuerpos específicos. Es equivalente al polo TT de la lepra.

RI (Tuberculosis reactiva intermedia): La localización es micronodular o intermedia con linfadenopatía unilateral o bilateral, con serosistis tuberculosa. La respuesta cutánea al PPD es positiva. es equivalente a la forma BT de la lepra.

UI (Tuberculosis intermedia no reactiva): La localización es nodular o micronodular difusa con cavitaciones y fibrosis. Los enfermos desarrollan una linfadenopatía complicada con formación de fistulas. Hay anergia al PPD. Es equivalente al polo BL de la lepra.

UU (tuberculosis no reactiva): Es miliar aguda. los enfermos no responden al PPD (son anérgicos). No hay estimulación específica de los linfocitos T in vitro y se forman complejos antígeno-anticuerpo. Es equivalente al polo LL de la lepra.

Bona y col.(21) han demostrado que los linfocitos B producen anticuerpos específicos durante la infección avanzada, mientras que los linfocitos T suprimen la respuesta inmunológica celular en contra de los antígenos de la micobacteria.

## 5.- EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

### 5.1). LOCALIZACION Y MAPA GENETICO

El Complejo Principal de Histocompatibilidad ha sido un candidato ideal para el análisis genético de las enfermedades por sus características, ya que juega un papel crítico en el control de la respuesta inmunológica y se ha confirmado que la susceptibilidad o resistencia genética a una gran variedad de enfermedades dependen de los genes en el MHC (22, 23, 24). El MHC ocupa una región genética que codifica para la síntesis de moléculas llamadas antígenos de histocompatibilidad, conocidos en el ratón como H-2 y en el humano como HLA (Antígenos de Leucocitos Humanos), los cuales están relacionados con diversas funciones inmunológicas fundamentales. Los productos del MHC participan en el rechazo agudo de tejidos cuando se efectúa un trasplante entre miembros genéticamente distintos de una misma especie y comprende una serie de genes cuyos productos son necesarios para que se inicie una respuesta específica y para que se lleven a cabo los mecanismos de regulación de la respuesta inmunológica (22, 23, 24).

El sistema HLA tiene una gran importancia evolutiva, se sabe que el MHC existe desde alrededor de hace 500 millones de años, y durante el tiempo han ocurrido mutaciones o cambios causados por deleciones o por la selección de genes funcionales que han dado origen a la expresión de nuevos genes HLA. Estos han generado nuevas familias génicas que ha conducido a una gran diversidad o polimorfismo. La evolución clonal de ciertos parásitos probablemente es una de las principales causas de la

generación del polimorfismo y éste se mantiene porque confiere una ventaja selectiva. La presencia de heterocigotos también tiene un efecto ventajoso en la sobrevivencia de la especie (25). Los parásitos parecen mutar continuamente lo que hace que se vayan seleccionando en el hospedero las variantes HLA ventajosas para combatir al parásito. La co-evolución de los parásitos y los genes HLA confiere al individuo la capacidad de responder a una gran variedad de patógenos (23, 25, 26). La variación antigénica de los parásitos ejerce una presión selectiva en el complejo HLA lo que ha favorecido el polimorfismo.

Los antígenos HLA intervienen como señales de reconocimiento esenciales entre las células del sistema inmunológico promoviendo interacciones que son relevantes para que se efectúe una respuesta inmunológica óptima ya sea, humoral celular o ambas (24).

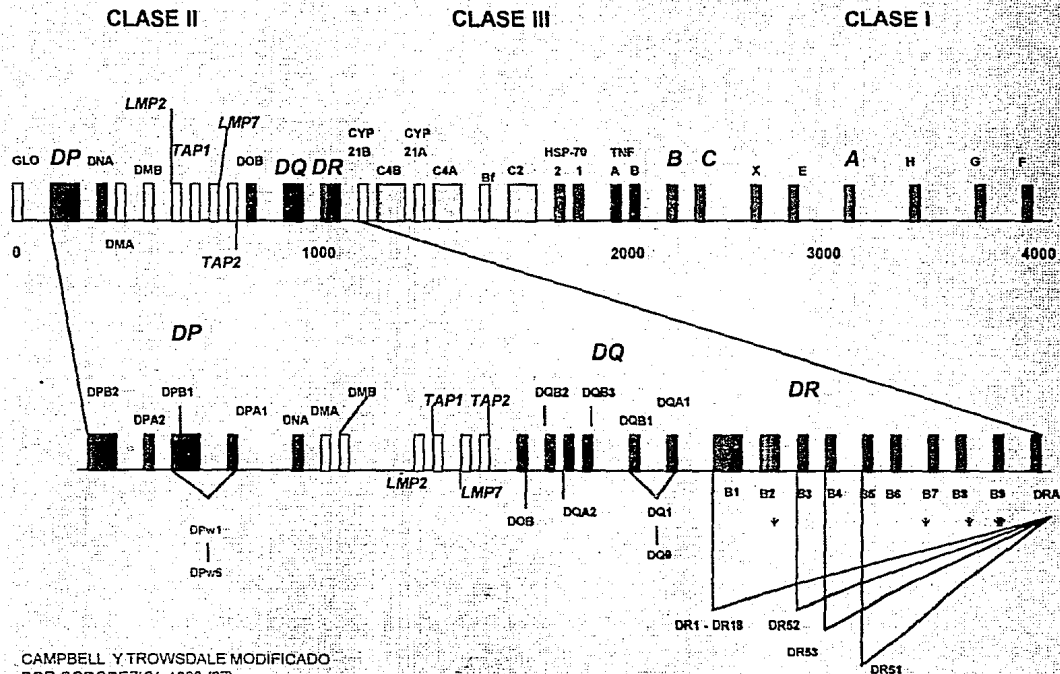
El mapa genético del sistema HLA se localiza en una pequeña región del brazo corto del cromosoma autosómico # 6, (no ligado al sexo). Ocupa 4000 Kb y está configurado como se observa en la figura 1 (27). Con base a su distribución tisular y a su estructura los genes y moléculas del MHC se dividen en tres clases: Los de clase I denominados también genes clásicos de histocompatibilidad abarcan las siguientes regiones genéticas o loci: HLA-A, HLA-B, HLA-C. Recientemente se han descrito nuevos genes que al parecer son potencialmente funcionales: HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-X, HLA-H HLA-7.5p y 9p, de los cuales sólo uno parece estar expresado sobre la superficie de algunos linfocitos que se encuentran en reposo y el resto son antígenos de

diferenciación importantes en el desarrollo embrionario (22, 23, 28, 29, 30).

Los genes clase II comprenden las siguientes regiones: HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DNA, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-TAP1, HLA-LMD, HLA-TAP2, HLA-LMP2, HLA-LMP7, HLA-DO.

La región de clas III comprende al menos 36 genes e incluye a los que codifican para la expresión de los factores del complemento C2 y C4 de la vía clásica del complemento y el factor Bf de la vía alterna. Los genes para el TNF-A y para la síntesis de la proteína de choque térmico Hsp70 están ubicados entre clase I y clase III. Los genes que codifican para la enzima 21-Hidroxilasa 21OHA y 21OHB llamados actualmente CYP21A y CYP21B, están intercalados entre los genes del complemento, que aunque no son antígenos HLA, son parte del MHC (30, 31, 32).

# MAPA DEL MHC HUMANO. EL COMPLEJO HLA



CAMPBELL Y TROWSDALE MODIFICADO  
 POR GORODEZKY, 1993 (27).

## 5.2).- ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS MOLECULAS DEL MHC

### Estructura molecular de los antígenos clase I

La región de clase I contiene a los genes que codifican para la expresión de los antígenos HLA-A,B,C, que se encuentran distribuidos en forma universal sobre todas las células nucleadas y algunos inclusive sobre los eritrocitos. Los loci E, F, G y H contienen a genes que son potencialmente funcionales y sólo uno de estos genes (HLA-E) parece expresarse en forma limitada en la superficie de los linfocitos que se encuentran en reposo mientras que los otros se hallan sobre tejidos embrionarios (29).

Los productos de clase I son reconocidos por las células T citotóxicas (Tc), involucradas en el reconocimiento y lisis de las células tumorales e infectadas por virus y constituyen la barrera más importante en la selección de donador-receptor para el trasplante de órganos. La función principal de los Tc es reconocer a los antígenos virales o tumorales en asociación con los antígenos clase I presentes en la superficie de las células infectadas, para destruir a las células infectadas en el contexto de la clase I propio, pero no pueden lisar a células con un haplotipo HLA diferente aunque la célula esté afectada por el mismo virus o tenga el mismo tumor. Este fenómeno se denomina " restricción MHC " (23, 33).

Estructuralmente, los antígenos de clase I son glicoproteínas formadas por dos cadenas polipeptídicas. Una cadena pesada denominada alfa que es muy polimórfica, transmembranal, con un peso molecular de 44 kD, que se encuentra flotando en la bicapa de lípidos de la membrana celular. Está

unida por un enlace no covalente a un pequeño péptido que es una proteína no polimórfica (no glicosilado) de 12 kD llamada B2 - microglobulina, codificada en el cromosoma 15. La cadena alfa contiene 33 residuos de aminoácidos y se divide en tres: La porción extracelular hidrofílica dividida en 3 dominios globulares (alfa 1, alfa 2 y alfa 3) cada uno de aproximadamente 90 residuos de aminoácidos de largo; la segunda porción es transmembranal hidrofóbica y va del aminoácido 282 al 306 y una intracelular hidrofílica de 31 residuos que van del 307 al 338 (28). El dominio alfa 3 y la B2m son relativamente conservados y muestran una secuencia de aminoácidos homóloga a los dominios conservados de la inmunoglobulina, en cambio los otros dos dominios (alfa 1 y alfa 2) son muy polimórficos (22, 26, 28, 33, 34, 35).

Gracias a los trabajos de cristalografía se conoce perfectamente su estructura tridimensional y se ha podido demostrar donde reside el polimorfismo, donde encajan los péptidos procesados del antígeno y a que residuos se unen para que las células T puedan reconocer a través de su receptor (TCR) al complejo péptido - clase I. Las moléculas HLA clase I son el blanco de los anticuerpos y de los Tc del receptor contra los tejidos del donador durante un trasplante cuando la pareja es incompatible. Los dominios alfa 1 y 2 forman una plataforma compuesta por una configuración de estructura B plegada, rodeada en los extremos por las alfa - hélices formando entre ellas una gran hendidura. La estructura B - plegada forma un nicho o un hueco que es donde radica la mayor parte del polimorfismo y donde se une el péptido. Dentro de las hélices se observa siempre una



zona densa que indica que el sitio está ocupado (34). De esta manera los linfocitos T citotóxicos reconocen a la molécula clase I que contiene siempre a un péptido asociado a ella y existe competencia de modo que cuando llega otro péptido puede sustituir al que está dentro (34).

#### Estructura molecular de los antígenos clase II

Los loci que codifican para la región de clase II, llamada anteriormente región D, se subdivide en las subregiones: DR, DQ, DP, DN, DO y las otras ya mencionadas. Como ya se mencionó sólo las tres primeras son funcionales. Los productos clase II se encuentran expresados sobre un número limitado de células que abarca a todas las CPA (macrófagos, monocitos, células epiteliales), a linfocitos B, linfocitos T activados por antígenos o mitógenos, linfocitos T cooperadores, o los que ejercen supresión (22, 33, 36). Los antígenos clase II están constituidos por 2 cadenas glicoproteicas, una cadena alfa de 34 kd y una cadena ligera beta de 29 kd, unidas por un enlace no covalente. La molécula tiene cuatro dominios: 2 extracelulares, una región transmembranal y un dominio citoplasmático. La región transmembranal esta conectada al dominio extracelular, mediante un péptido hidrofílico (36). Cada subregión tiene un gen A y un gen B con excepción del DN que tiene un gen A y el DO que tiene un gen B. Las moléculas clase II son las proteínas más polimórficas y cada gen tiene alelos múltiples. Debido a la capacidad que tienen las células T para reconocer a los antígenos extraños y proliferar por las diferencias con las moléculas clase II alogénicas, se produce una respuesta in vitro en el cultivo

de mezcla de linfocitos, con la que se definen los antígenos Dw, y mediante el CML secundarios o PLT (Primed lymphocyte Test) se identifican a las variantes del locus DP. Sin embargo, recientemente las técnicas moleculares han permitido identificar con precisión a los alelos usando métodos como los RFLPs y el PCR con el que se ve claramente el micropolimorfismo (22, 36, 37).

Dentro de la subregión DR, están los genes DRA que codifican para DR alfa que es la cadena no polimórfica y los genes DRB1, DRE2, DRB3, DRB4, DRB5 y DRB6 de los cuales DRB2 y DRB6 son pseudogenes, es decir que no se expresan. DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5 codifican respectivamente para la síntesis de las cadenas beta 1, beta 3, beta 4 y beta 5. La unión de la cadena DR alfa con DRB1 da lugar a la expresión de los antígenos DR1 al DR18. La unión de DR alfa con DRB3 propicia la síntesis de los antígenos del grupo DR52 que se expresan en los haplotipos DR3, 5, 6 y 8. La unión de DR alfa con DRB4 produce la expresión de DR53 que se asocia con los haplotipos DR4, 7 y 9 y la DR alfa con DRB5 expresa el DR51 que está en los haplotipos DR15 y DR16 (FIG. 1) (38).

La cadena beta es de 237 aminoácidos de largo. La región polimórfica está en el dominio extremo llamado B1 y la región conservada en B2. En la subregión DQ están los genes DQA1 y DQB1 que dan lugar a la expresión de las cadenas alfa y beta. Ambas son polimórficas. En esta región también están DQA2 y DQB2 que no se expresan, ya que al igual que los otros pseudogenes de clase II tienen múltiples secuencias defectuosas.

En la región DP están los pseudogenes DPA2 y DPB2 y un par de genes que si se expresan (DPA1 y DPB1) y propician la síntesis de las cadenas DP alfa y DP beta. La cadena DP alfa es similar a los otros clase II-alfa y tiene un polimorfismo limitado mientras que toda la variabilidad radica en la cadena B. El polimorfismo de DP es tan grande que hoy existen 46 alelos DPB1 (36, 38).

### Estructura molecular de los genes clase III

Clase III se localiza entre las regiones clase I y clase II. Abarca cuatro tipos de genes de los que dos están relacionados con funciones inmunológicas. Manifiestan un grado moderado de variabilidad genética, pero no están sujetos a mecanismos evolutivos como se observa en los genes clase I y II del complejo HLA. Incluyen genes conservados y duplicados debido a procesos de recombinación ocurridos durante la meiosis (31).

Entre los genes clase I y los clase III se encuentran los A y B del TNF (Factor de Necrosis Tumoral), el TNF-B codifica para la linfotoxina y el TNF-A para la caquectina. La enzima citocromo P450, gobierna la síntesis de los esteroides de la 21-hidroxilasa (CYP21A y CYP21B) de los que el 21B es el gen funcional, ya que la delección de ciertas secuencias de este gen conduce a la manifestación de la hiperplasia suprarrenal congénita. Están ubicados entre C4A y C4B. Los macrófagos y linfocitos T secretan los factores de necrosis tumoral tanto alfa como beta durante la inducción de la respuesta inmunológica o por activación de macrófagos por lipopolisacáridos. Al igual que las linfocinas, la IL-1 y el interferón alfa, el TNF alfa

está involucrado en los efectos celulares de la inflamación. Inhibe a la enzima que almacena grasa, importante en el mecanismo por el cual actúa en contra de los tumores. El TNF también estimula la transcripción de genes clase I (31).

El sistema del complemento consta de una serie de proteínas que constituyen una cascada proteolítica cuando se unen al complejo antígeno-anticuerpo resultado de la inserción de complejos tubulares dentro de la membrana de las células blanco, dando como consecuencia la destrucción de la membrana celular. De los productos clase III el C2 (102 kd) y el C4 participan en la vía clásica de la siguiente manera: el primer componente del complemento C1 se une al complejo Ag-Ac y se activa una proteasa que activa al C4 y C2. La actividad del C4 y C2 unidos al complejo Ag-Ac y la proteasa activan el C3. Las funciones del FB (90 kD) en la vía alterna de la activación del complemento, pueden ser inducidas por el complejo Ag-Ac o por otras sustancias como los polisacáridos que se encuentran en la pared celular de las bacterias (31).

El C4 (200 kD contiene 3 cadenas de 79, 95 y 30 kD denominadas alfa, beta y gama respectivamente. El C1 activa a C4 por la ruptura de un péptido de 7 kD del amino terminal de la cadena alfa. Se activa C2 y C4 por la C3 convertasa y C4 se rompe en C4A y C4B. Estas variantes se heredan como el resto del complejo HLA y al menos 7 alelos de cada locus se presentan con una frecuencia menor del 1%. C4AO (alelo nulo) existe con una frecuencia de un 10% y C4BO en un 20%. Los pacientes con ausencia de C4 son propensos a infecciones frecuentes y a enfermedades autoinmunes, lo mismo que los portadores de alelos nulos de C4A

como en el lupus eritematoso diseminado. Esto podría deberse a un desequilibrio de enlace con los verdaderos genes de susceptibilidad HLA o podría ser un efecto biológico de la ausencia de C4A (31).

Las proteínas de choque térmico (HSPs), están muy relacionadas con la respuesta inmunológica. Son altamente conservadas, muy abundantes y juegan un papel muy importante en el ensamble de nuevas proteínas. Sirve como señales cuando se inicia una infección, intervienen en la inflamación, ya que son antígenos inmunodominantes en muchas bacterias y provocan fenómenos de autoinmunidad por reactividad cruzada con los antígenos bacterianos. También ocasionan la desnaturalización de proteínas del macrófago, acelerando la limpieza de materiales infectados (32, 39). La HSP70 se localiza entre el TNF y clase III y es muy importante en el procesamiento del antígeno para la presentación del péptido mediante las moléculas clase II (39).

El sistema HLA es extraordinariamente polimórfico ya que está constituido por múltiples alelos en cada locus. En el XI Taller Internacional de Histocompatibilidad, se adicionaron las nuevas especificidades serológicas y alelos moleculares. Así, hay en el locus A 27 antígenos, 59 en el locus B, 10 en el locus C, 26 en el locus D, 21 en el locus DR, 9 en el locus DQ y en la región DP hay 6 (cuadro 1). En total existen 159 antígenos descritos y 277 alelos o variantes moleculares.

CUADRO 1

ANTIGENOS DEFINIDOS POR TECNICAS CONVENCIONALES Y ALELOS MOLECULARES DESCRITOS EN EL XI TALLER INTERNACIONAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD 1991, (38).

ALELOS	VARIANTES ALELICAS	ANTIGENOS
HLA-A	41	27
HLA-B	61	59
HLA-C	18	10
HLA-E	4	-
<u>TOTAL</u>	<u>124</u>	<u>96</u>
HLA-DRA	2	-
HLA-DRB1	60	21
HLA-DRB3	4	1
HLA-DRB4	1	1
HLA-DRB5	4	1
HLA-DRB6	3	-
<u>TOTAL</u>	<u>74</u>	<u>24</u>
HLA-D	-	26
<u>TOTAL</u>		<u>26</u>
HLA-DQA	14	-
HLA-DQB	19	9
<u>TOTAL</u>	<u>33</u>	<u>9</u>
HLA-DPA	8	-
HLA-DPB	38	6
<u>TOTAL</u>	<u>46</u>	<u>6</u>
<u>TOTAL</u>	<u>277</u>	<u>159</u>

En el cuadro 2 se enlistan los antígenos y alelos oficialmente descritos hasta 1991 (33). Como se observa en el cuadro existen una gran cantidad de alelos que sólo se pueden identificar por métodos moleculares y cuyo antígeno no se puede diferenciar con métodos convencionales. Por ejemplo existen 12 variantes moleculares del A2 que no se pueden distinguir usando serología.

CUADRO 2

ANTIGENOS Y ALELOS HLA OFICIALMENTE DESCRITOS, EN EL XI TALLER INTERNACIONAL, 1991 (38).

ANTIGENO	ALELO	ANTIGENO	ALELO
LOCUS HLA-A		LOCUS HLA-B	
A1	A*0101	B7	B*0701
A2	A*0201	B7	B*0702
A2	A*0202	B703	B*0703
A203	A*0203	B8	B*0801
A2	A*0204	B13	B*1301
A2	A*0205	B13	B*1302
A2	A*0206	B14	B*1401
A2	A*0207	B65(14)	B*1402
A2	A*0208	B62(15)	B*1501
A2	A*0209	B75(15)	B*1502
A210	A*0210	B72(70)	B*1503
A2	A*0211	B62(15)	B*1504
A2	A*0212	B18	B*1801
A3	A*0301	B27	B*2701
A3	A*0302	B27	B*2702
A11	A*1101	B27	B*2703
A11	A*1102	B27	B*2704
A23(9)	A*2301	B27	B*2705
A24(9)	A*2401	B27	B*2706
A24(9)	A*2402	B27	B*2707
A2403	A*2403	B35	B*3501
A25(10)	A*2501	B35	B*3502
A26(10)	A*2601	B35	B*3503
A29(19)	A*2901	B35	B*3504
A29(19)	A*2902	B35	B*3505
A30(19)	A*3001	B35	B*3506
A30(19)	A*3002	B37	B*3701
A31(19)	A*31011	B38(16)	B*3801
A31(19)	A*31012	B3901	B*3901
A32(19)	A*3201	B3902	B*3902
A33(19)	A*3301	B60(40)	B*4001
A34(10)	A*3401	B40	B*4002
A34(10)	A*3402	B40	B*4003
A36	A*3601	B40	B*4004
A43	A*4301	B4005	B*4005
A66(10)	A*6601	B41	B*4101
A66(10)	A*6602	B42	B*4201
A68(28)	A*6801	B44(12)	B*4401
A68(28)	A*6802	B44(12)	B*4402
A69(28)	A*6901	B44(12)	B*4403
A74(19)	A*7401	B45(12)	B*4501
		B46	B*4601
Cw1	Cw*0101	B47	B*4701
Cw1	Cw*0102	B48	B*4801
Cw2	Cw*0201	B49(21)	B*4901
Cw2	Cw*02021	B50(21)	B*5001

ANTIGENO	ALLELO	ANTIGENO	ALLELO
LOCUS HLA-C		LOCUS HLA-B	
Cw2	Cw*02022	B51(5)	B*5101
Cw3	Cw*0301	B5102	B*5102
Cw3	Cw*0302	B5103	B*5103
Cw4	Cw*0401	B52(5)	B*5201
Cw5	Cw*0501	B53	B*5301
Cw6	Cw*0601	B54(22)	B*5401
Cw7	Cw*0701	B55(22)	B*5501
Cw7	Cw*0702	B55(22)	B*5502
Cw8	Cw*0801	B56(22)	B*5601
Cw8	Cw*0802	B56(22)	B*5602
-	Cw*1201	B57(17)	B*5701
-	Cw*1202	B57(17)	B*5702
-	Cw*1301	B58(17)	B*5801
-	Cw*1401	B7801	B*7801
		-	B*7901
LOCUS HLA -E		LOCUS HLA-DR	
-	E*0101	-	DRA*0101
-	E*0102	-	DRA*0102
-	E*0103	DR1	DRB1*0101
-	E*0104	DR1	DRB1*0102
		DR103	DRB1*0103
		DR15(2)	DRB1*1501
		DR15(2)	DRB1*1502
		DR15(2)	DRB1*1503
		DR16(2)	DRB1*1602
		DR17(3)	DRB1*0301
		DR18(3)	DRB1*0302
		DR18(3)	DRB1*0303
		DR4	DRB1*0401
		DR4	DRB1*0402
		DR4	DRB1*0403
		DR4	DRB1*0404
		DR4	DRB1*0405
		DR4	DRB1*0406
		DR4	DRB1*0407
		DR4	DRB1*0408
		DR4	DRB1*0409
		DR4	DRB1*0410
		DR4	DRB1*0411
		DR4	DRB1*0412
DQ5(1)	DQB1*0501	DR11(5)	DRB1*11011
DQ5(1)	DQB1*0502	DR11(5)	DRB1*11012
DQ5(1)	DQB1*05031	DR11(5)	DRB1*1102
DQ5(1)	DQB1*05032	DR11(5)	DRB1*1103
-	DQB1*0504	DR11(5)	DRB1*11041
DQ6(1)	DQB1*0601	DR11(5)	DRB1*11042
DQ6(1)	DQB1*0602	DR11(5)	DRB1*1105
DQ6(1)	DQB1*0603	DR11(5)	
DQ6(1)	DQB1*0604	DR11(5)	



ANTIGENO	ALELO	ANTIGENO	ALELO
LOCUS HLA-DQ		LOCUS HLA-DR	
DQ6(1)	DQB1*0605	DR12(5)	DRB1*1201
-	DQB1*0606	DR12(5)	DRB1*1202
DQ2	DQB1*0201	DR13(6)	DRB1*1301
DQ7(3)	DQB1*0301	DR13(6)	DRB1*1302
		DR13(6)	DRB1*1303
DQ8(3)	DQB1*0302	DR13(6)	DRB1*1304
DQ9(3)	DQB1*03031	DR13(6)	DRB1*1305
DQ9(3)	DQB1*03032	DR13(6)	DRB1*1306
DQ7(3)	DQB1*0304	DR14(6)	DRB1*1401
DQ4	DQB1*0401	DR14(6)	DRB1*1402
DQ4	DQB1*0402	DR14(6)	DRB1*1403
		DR14(6)	DRB1*1404
		DR14(6)	DRB1*1405
		DR14(6)	DRB1*1406
		DR14(6)	DRB1*1407
		DR14(6)	DRB1*1408
		DR14(6)	DRB1*1409
		-	DRB1*1410
	DPA1*0201	DR7	DRB1*0701
	DPA1*02021	DR7	DRB1*0702
	DPA1*02022	DR8	DRB1*0801
	DPA1*0301	DR8	DRB1*08021
	DPA1*0401	DR8	DRB1*08022
DPw1	DPB1*0101	DR8	DRB1*08031
DPw2	DPB1*0201	DR8	DRB1*08032
DPw2	DPB1*02011	DR8	DRB1*0804
DPw2	DPB1*02012	DR8	DRB1*0805
DPw2	DPB1*0202	DR9	DRB1*09011
DPw3	DPB1*0301	DR9	DRB1*09012
DPw4	DPB1*0401	DR10	DRB1*1001
DPw4	DPB1*0402		
DPw5	DPB1*0501		
DPw6	DPB1*0601	DR52	DRB3*0101
-	DPB1*0801	DR52	DRB3*0201
-	DPB1*0901	DR52	DRB3*0202
-	DPB1*01001	DR52	DRB3*0301
-	DPB1*01101		
-	DPB1*1301	DR53	DRB4*0101
-	DPB1*1401		
-	DPB1*1501	DR51	DRB5*0101
-	DPB1*1601	DR51	DRB5*0102
-	DPB1*1701	DR51	DRB5*0201
-	DPB1*1801	DR51	DRB5*0202
-	DPB1*1901		
-	DPB1*2001	-	DRB6*0101
-	DPB1*2101	-	DRB6*0201
-	DPB1*2201	-	DRB6*0202
-	DPB1*2301		
-	DPB1*2401		
-	DPB1*2501		
-	DPB1*2601		
-	DPB1*2701		

ANTIGENO	ALELO	ANTIGENO	ALELO
LOCUS HLA-DP			
-	DPB1*2801		
-	DPB1*2901		
-	DPB1*3101		
-	DPB1*3201		
-	DPB1*3301		
-	DPB1*3401		
-	DPB1*3501		
-	DPB1*3601		
- NO TIENE EQUIVALENCIA EN ANTIGENOS			

Los antígenos HLA se heredan siguiendo la primera ley de Mendel, en forma codominante. Se transmite un cromosoma de cada progenitor y por lo tanto cada individuo tiene 2 haplotipos HLA, expresando 14 antígenos; 2 de cada locus. Por herencia mendeliana simple, hay un 25 % de probabilidades de que 2 hermanos compartan ambos haplotipos, 50% de probabilidad de que compartan uno y un 25% de que no compartan ninguno (40).

Los antígenos HLA se dividen en privados, públicos y supratípicos. Los que se encuentran en la molécula determinada por un sólo alelo se denominan antígenos privados (por ejemplo el A25, A11, B18, DR7). Los antígenos públicos son determinantes comunes a varias moléculas HLA cada una de las cuales tiene secuencias de uno o más antígenos HLA privados distintos. Por ejemplo, el A9 se divide en A23 y A24, el A28 se divide en A68 y A69. Así, un individuo que es A23 o A24 también es A9. Y los supratípicos son el Bw4 y Bw6, de clase I y DR51, DR52 y DR53 de clase II. Por ejemplo el Bw4 contiene entre otras, secuencias de B27, 51, 52, 53, 57, 63 y muchos otros. El Bw6, de B7, 35, 62, 41, 42 y otros. El DR51 contiene al DR15 y 16; el DR52 a DR3, 5, 6, 8, y DR53 contiene al DR4, 7 y 9 (40).

## 6). ASOCIACION HLA Y ENFERMEDADES

Actualmente hay más de 500 entidades clínicas que se han asociado al MHC (41). Dichas asociaciones se agrupan en cuatro categorías:

- a). Asociadas a antígenos clase I
- b). Las espondiloartropatías relacionadas al B27
- c). Las asociadas a clase II
- d). Las relacionadas con clase III y las enfermedades unigénicas debidas a defectos en enzimas como la 21-OH.

En el cuadro 3 se resumen las principales enfermedades asociadas.

Los hallazgos evidentes de participación de genes de susceptibilidad ligados al MHC en muchas enfermedades y el hecho de que en algunos casos parecen conferir protección ha llevado a tratar de elucidar los posibles mecanismos de asociación para entender la etiopatogénesis de las enfermedades con fondo genético y contar en un futuro próximo con métodos preventivos y terapias genéticas e inmunológicas.

## 7. MECANISMOS DE ASOCIACION H L A

Cuando una sustancia extraña entra a un organismo se desencadena una respuesta inmunológica específica de tipo humoral, celular o ambas. Esto implica la internalización del antígeno dentro del macrófago en un endosoma con medio ácido, donde se produce la degradación proteolítica del antígeno, y la unión de los péptidos a las moléculas de clase II en la superficie celular. Así, los macrófagos son por una parte

CUADRO 3

ENFERMEDADES PRINCIPALES ASOCIADAS A HLA

ENFERMEDAD	ASOCIACION	ENFERMEDAD	ASOCIACION
<u>HEMATO/ONCOLOGICAS</u>		<u>REUMATOLOGICAS</u>	
Anemia linfoblástica aguda	DPw5	Espondilitis anquilosante	B27
Enf. Hodgkin	A1	Síndrome de Reiter	B27
Cáncer Nasofaríngeo	B46	Artritis reumatoide (ARA)	DR4
Deficiencia de IgA	A1	Artritis reumatoide juvenil	DR8
Sarcoma de Kaposi	DR5		
SIDA	DR5		
Cáncer tiroideo	DR7		
Leucemia HTLV1	DQ3		
<u>NEFROLOGICAS</u>		<u>OFTALMOLOGICAS</u>	
Síndrome nefrótico infantil	-	Uveítis anterior aguda	B27
Forma córtico sensible	DR7	retinopatía	A29
<u>Forma córtico resistente</u>	DR3	<u>ENFERMEDADES AUTOINMUNES Y/O ENDOCRINOLOGICAS</u>	
Síndrome de Goodpasture	DR2	Deficiencia en 21-OH	-
		forma congénita	B47
		forma tardía	B14
		Diabetes tipo I	DR3/4
<u>PATOLOGIA DIGESTIVA</u>			DR2
Hemacromatosis	A3	Tiroiditis de Hashimoto	DR3
Enfermedad celíaca	DR3/7	Enfermedad del Basedow	DR3
Cirrosis biliar primaria	DR3	Enfermedad de Addison	DR3
Hepatitis crónica activa	DR3	Miastenia grave	DR3
		Tiroiditis de Quervain	B35
		Síndrome de Sjögren	DR3
<u>NEUROLOGICAS</u>			
Esclerosis múltiple	DR2	Lupus eritematoso	DR3
Esclerosis múltiple (México) *	DR13	diseminado	DR3, DR4
Neuritis óptica	DR2		
Narcolepsia	DR2		
Síndrome de Guillain**	DR3		
Barré forma crónica			
<u>INFECCIOSAS Y PARASITARIAS</u>		<u>DERMATOLOGICAS</u>	
Lepra tuberculoides	DR2,	Soriasis	Cw6
Lepra tuberculoide (México)***	DR3	Pénfigo vulgar	DR4
Lepra lepromatosa (México)****	DR2, DQ1	Dermatitis herpetiforme	DR3
Neurocisticercosis*****	A28,	enfermedad de Behcet	B51
parenquimatosa	DQ2		

En este cuadro se enlistan las enfermedades más importantes (41, 46).

\*= 42    \*\*= 43    \*\*\*= 44    \*\*\*\*= 24    \*\*\*\*\*= 45

inductores de la respuesta, actuando como CPAs para los linfocitos T y, al mismo tiempo, actúan en la fase efectora de la inmunidad celular, al ser activados por las linfoquinas liberadas por los linfocitos estimulados.

La función de los clase II es la de presentar a los antígenos uniendo péptidos diversos de los antígenos propios o extraños para presentar a los linfocitos T. Los antígenos son procesados dentro de las CPA y los péptidos son captados por el clase II (si proviene de una proteína de bacteria, hongo o parásito o sea de un antígeno exógeno) o por el clase I si el péptido es endógeno (es decir tumoral o viral). En el primero se presenta en un linfocito T cooperador y en el segundo al Tc formando el complejo clase II-péptido-TCR. La unión de los fragmentos antigénicos con las moléculas de clase I, requiere de péptidos que son degradados por los LMP en el citoplasma y transportados por los TAP al retículo endoplásmico para unirse a las moléculas de clase I. En forma asociada se transportan a la membrana para presentar el péptido al TCR de la célula Tc.

Las moléculas de clase II requieren de la Hsp70 que tiene un papel importante en el transporte de los péptidos. Bajo condiciones de pH ácidos se favorece la formación del complejo péptido-moléculas clase II. La HSP-70 facilita la ruptura de proteínas y las moléculas TAP transportan a los péptidos endógenos para que se unan al clase I (39, 47).

Las cadenas alfa y beta de las moléculas de clase II se sintetizan en el retículo endoplásmico y se asocian rápidamente a la cadenas invariable, la cual se disocia en el endosoma antes de unirse el clase II al péptido. La configuración de la molécula

clase II cambia por la unión con el péptido lo cual lo hace una proteína estable (39).

La unión del péptido también altera la conformación de la molécula clase I. La B2m es necesaria para estabilizar a la molécula clase I y tal vez para ayudar a mantener algunos péptidos exógenos. El péptido se une a la molécula clase I- B2m y ésta se disocia en la superficie celular. El antígeno es internalizado y procesado dentro del espacio extracelular por las moléculas LMP2 y LMP7. El complejo es inestable si el péptido está debilmente unido y se disocia en la superficie celular. Los péptidos-clase I de baja afinidad son substituidos en el reticulo endoplásmico permitiendo la unión de otros que son transportados al reticulo endoplásmico por las moléculas TAP-1 y TAP-2 (39, 47). Estos hallazgos son esenciales para explicar los mecanismos de asociación a las enfermedades de los que se han propuesto varios que deben tomarse con cierto cuidado ya que es importante considerar las características clinicas y etiológicas y la naturaleza de cada una de las enfermedades asociadas. Los mecanismos postulados son los siguientes:

#### 7.1 HIPOTESIS DE RECEPTORES (41, 46)

Se sugiere que los antígenos HLA pueden actuar como receptores de la superficie celular de algunos patógenos. En el caso de la espondilitis anquilosante el B27 podría ser el receptor de algunas bacterias (K. pneumoniae) relacionadas con el síndrome de Reiter, y otras espondiloartropatias asociadas al B27. Helenius y col.(citado en 41) demostraron que las proteínas de los loci HLA-A y B en el hombre, y de los loci H-2K y H-2D en

el ratón funcionan como receptores para el virus Semliki Forest (citado en 41). Haspel y col. (citado 41) describieron la interacción de los antígenos HLA con antígenos del virus del sarampión, ya que encontraron antígenos virales insertados en las membranas que permanecen físicamente unidos a los antígenos HLA. Sin embargo, ninguno de los antígenos HLA funciona realmente como receptor ya que no incorporan a los virus maduros para introducirlos a la célula e infectarla. De aquí se deduce que los antígenos HLA no son los receptores de virus, pero sí pueden conferir algunos resistencia y otros susceptibilidad a las infecciones virales.

## 7.2 MIMETISMO MOLECULAR

Se ha propuesto que el mimetismo molecular actúa como una presión selectiva más que conduce al polimorfismo de las moléculas HLA. El mimetismo de determinantes antigénicos de los patógenos con estructuras de moléculas del MHC puede ser un mecanismo de adaptación muy importante (25, 46). Esta hipótesis fue originalmente propuesta por Snell (citado en 41), quien postuló que la estructura de los agentes infecciosos puede ser muy similar en algunas partes de la molécula HLA. Debido a este mimetismo, el hospedero no puede reconocer al patógeno como totalmente extraño y, por consiguiente, el sistema inmunitario se ve incapacitado de iniciar una respuesta adecuada en contra del agente invasor (citado en Klein 41).

Algunos trabajos en Australia e Inglaterra demostraron que existe una reactividad cruzada entre el B27 y la Klebsiella, que puede explicar la asociación del B27 con las

espondiloantropatías seronegativas en los casos con antecedentes infecciosos por Klebsiella o Yersinia. No obstante, actualmente se ha propuesto que las regiones conservadas en el nicho del B27 (sitio de unión del antígeno HLA con el péptido) reconocen el péptido propio en la articulación y esto conduce a la respuesta inflamatoria y al establecimiento de la enfermedad en individuos sin antecedentes infecciosos. Ciertas enfermedades con antecedentes infecciosos y tal vez las autoinmunes podrían ser también el resultado del mimetismo molecular entre algunos patógenos y la molécula HLA (35, 48).

### 7.3 INTERACCION DE LAS MOLECULAS HLA CON LIGANDOS NO INMUNOLOGICOS

Svejgaard y Ryder (citado en 41) postularon que los antígenos HLA pueden interferir con algunos ligandos-receptores que participan en funciones no inmológicas. Sugieren que algunas moléculas pudieran tener estructuras similares a los receptores de ciertas hormonas y por lo tanto competir con los receptores hormonales propiciando bajo ciertas condiciones, enfermedades no inmunológicas, como son la hemocromatosis idiopática (49).

### 7.4 MODIFICACION VIRAL DE LOS ANTIGENOS PROPIOS

El reconocimiento del péptido viral por clase I puede ocasionar que se exprese un péptido propio modificado y el reconocimiento por el linfocito T depende de la secuencia complementaria que exista entre las cadenas alfa y beta del TCR con las secuencias del virus. McMichael y col. (citado en 41) observaron este fenómeno para algunos virus como el de influenza (citado en 46).



## 7.5 GENES QUE ESTAN ESTRECHAMENTE LIGADOS CON EL COMPLEJO H L A

Esta hipótesis propone que los antígenos HLA no son directamente la causa de las enfermedades. Se ha sugerido que en algunos casos la asociación HLA probablemente se deba al desequilibrio de ligamento existente entre los antígenos HLA y los verdaderos alelos de susceptibilidad a la enfermedad. La presencia de la enfermedad y el marcador HLA en una pequeña población, podría explicarse de diferentes formas: (a) Los factores genéticos no están ligados al HLA, (b) La enfermedad es heterogénea y podría tener más de un factor etiológico, (c) los factores ambientales, tales como la exposición a los virus, determina si los individuos con el gen de susceptibilidad van a manifestar la enfermedad, d) si no se identifica la asociación con el alelo puede deberse a que la frecuencia de la enfermedad es muy baja y al ser la asociación HLA incompleta no se ve la diferencia entre sanos y enfermos. La asociación del DR2 con esclerosis múltiple en asiáticos o en mexicanos, son poblaciones en las que la incidencia es menor de 1/100,000 habitantes por año, es difícil pero si se logra establecer la relación como es el caso de mexicanos en que se demostró la participación del DR2 y DR13 quiere decir que la participación del gen HLA es real. En esta hipótesis se propone que el gen de susceptibilidad a la esclerosis múltiple, se originó por mutaciones en un individuo prehistórico y fue transmitido de generación en generación (42).

## 7.6 GENES DE RESPUESTAS INMUNOLOGICAS

Algunas asociaciones HLA se deben a la existencia de los genes de respuesta inmunológica (Ir) y genes de supresión inmunológica (Is) localizados en la región de clase II (22, 24, 28, 50, 51). Se sugiere que para el patógeno desencadenante de una enfermedad particular existe un gen Ir o Is que regula la capacidad de respuesta inmunológica contra él. Algunos ejemplos de esto son los estudios hechos por Hirayama y col (52), en los que demostró que la respuesta proliferativa de las células T contra proteínas purificadas del estreptococo y los antígenos esquistosomales (sv) dependen de la presencia del DR2, DQ1 (DRB1\*1501) y para Sclo el DRB1\*1502 (Hirayama y col., 1987) (52).

Gorodezky y col. (24) demostraron que la supresión celular específica que existe en la lepra lepromatosa depende de un gen Is ligado al DQ1. Así, si un individuo sano DQ1 se expone a M. leprae, lo más probable es que desarrollará la forma maligna del padecimiento, porque los péptidos de la micobacteria que se asocian a este antígeno seguramente inducen la activación de los mecanismos celulares de inmunosupresión (24).

## 7.7 GENES METABOLICOS

Es posible que otros genes estén involucrados en la respuesta y en la supresión inmunológica ligados al sistema HLA. Estos podrían ser los responsables de las enfermedades con bases aparentemente no inmunológicas y podrían afectar algunas vías metabólicas por la acción de algunas enzimas como la glioxalasa, la 21-OH u otras (41).

## 7.8 MECANISMOS MOLECULARES DE ASOCIACION EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

La Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMID) afecta cerca del 0.5% a las poblaciones caucasoides, aparece generalmente antes de los 20 años de edad y es el resultado de la destrucción selectiva de las células productoras de insulina (células Beta) del páncreas. La insulina regula el metabolismo de la glucosa, cuya deficiencia provoca hiperglucemia, acidosis diabética y coma. Con base al análisis de datos obtenidos del locus DR y DQ, utilizando técnicas moleculares se ha demostrado que los genes DQA y DQB participan intensamente en la susceptibilidad y en la protección de la enfermedad aunque el locus DRB1 también contribuye en forma importante en algunas poblaciones. La alta correlación de la ausencia de ácido aspártico en DQB-57 de los enfermos comparativamente con los sanos, indica que este es un gen muy importante en la susceptibilidad. La cadena DQA también contribuye ya que cuando hay arginina en la posición 52 y ausencia de aspártico en DQB-57 el riesgo se incrementa mucho. Esto indica como un aminoácido puede tener un efecto de cargas en la estructura que influye en la función o en la unión de las cadenas alfa y beta al péptido propio, ya que dependiendo del tipo de aminoácido que haya en estas dos posiciones, se asociará el péptido propio, con mayor o menor afinidad a la molécula clase II para propiciar la unión con el TCR y desencadenar la respuesta autoinmune (37, 46, 53).

La artritis reumatoide es una enfermedad de etiología desconocida que involucra a las pequeñas articulaciones,

que provoca inflamación y daño articular severo. Hay anticuerpos en contra de antígenos propios del tejido articular es seropositiva y está asociada con el DR4, aunque en algunas poblaciones (Indúes, Paquistanas, Israelíes) se asocia a DR1 y DR10. El subtipo DR4-Dw10 (\*0402) no se asocia con ARA.

Con técnicas moleculares se confirmó que el DR4 presenta 12 variantes alélicas denominadas DRB1\*0401 - DRB1\*0412 del DR4 cuyas variantes no se pueden indentificar serológicamente. Estos alelos difieren entre sí en 1 - 5 aminoácidos localizados entre los residuos 76 - 74 del dominio externo B1 de la cadena DRB. Estos alelos DR4 tienen diversos desequilibrios con los genes DQA1 y DQB1 lo cual produce una gran diversidad dentro de la familia de los haplotipos DR4. Ciertos subtipos condicionan la susceptibilidad a la ARA (DRB1\*0401, DRB1\*0404, DRB1\*0405, DRB1\*0408) en caucasoides y el DRB1\*0402, DRB1\*0403 y DRB1\*0407 parecen conferir resistencia al padecimiento. Los residuos 76 - 74 en el alfa hélice del sitio de unión al antígeno de la tercera región hipervariable del dominio DRB1, interactúan con el péptido que se une al nicho del clase II y con el TCR para desencadenar la respuesta autoinmune. Esta interacción se explica por la hipótesis de "epitopes compartidos": a) las sustituciones de radicales en la tercera región hipervariable del alelo DRB1\*0401 elimina el riesgo de padecer ARA (DRB1\*0402, \*0403 y \*0407). b) la glicina en la posición 86 se asocia ala ARA en los alelos que no tienen los aminoácidos "protectores" (DRB1\*1402, \*0101 y \*0408). c) DRB1\*0404 es neutral para la susceptibilidad, pues ni tiene sustituciones en la tercera región, ni tiene glicina en 86 (27).

## 8.- PARTICIPACION DE FACTORES GENETICOS EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR

Las asociaciones HLA se demuestran mediante el incremento o la disminución de las frecuencias de un alelo o antígeno HLA en cierta enfermedad comparándose con la frecuencia del mismo marcador en individuos sanos, pertenecientes al mismo grupo étnico (24, 41, 46). Los genes Ir también parecen jugar un papel central en las enfermedades micobacterianas y probablemente en la respuesta individual a las vacunas o a los antígenos específicos, ya que las diferencias genéticas individuales determinan la capacidad de reactividad (54). Existen algunos estudios del MHC y su relación con la TB pulmonar que se describen a continuación: y que se enlistan en el cuadro 4.

La TB y la lepra tienen muchas similitudes por lo que aquí se incluye la información revisada por Gorodezky (24) en relación con la participación del MHC en la lepra, desde 1972 en que Escobar, Gorodezky y Salazar-Mallén publicaron una disminución de los antígenos A2 y A3 en la lepra lepromatosa (LL) (55). Actualmente se sabe que los productos HLA juegan un papel central en el desencadenamiento de las formas polares de la lepra que determinan el patrón de respuesta individual que los enfermos presentan ante la exposición al antígeno específico lo cual depende de los genes Ir o Is (24, 50, 56).

La mayor parte de los estudios relacionados con la TB muestran asociaciones débiles con antígenos del locus B o ausencia de una relación con los clase I (57, 58, 59, 60, 61, 62), los últimos informes señalan que los clase II si participan en la TB.

CUADRO 4  
PARTICIPACION DEL MHC EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR

GRUPO ETNICO	ASOCIACION		REFERENCIA
	POSITIVA (SUSCEPTIBILIDAD)	NEGATIVA (RESISTENCIA)	
Griegos	B27		63
Norte de la India	DR2	DR6	56, 57, 64, 65, 66
Chinos del Norte	A11, B15	Cw3	62
Coreanos	B8, B51, B54, B62, Cw1 DR1 y DR3	A33 DR5, DR9	66
Negros Americanos	DR5, B5, B15	DR6	66
Indonesios	DR2, DQ1	DR3	67
Chinos	B35, B27	A19	68
Chinos	B35		69
Egipcios	A2, B5		66
Caucasoides de New Foundland	B8		60, 62, 70
Mexicanos Americanos	-	-	60

Singh y col (57) demostraron que un incremento del DR2 va acompañado de una disminución del DR6 (50, 55, 64, 65), lo cual es realmente interesante porque también el DR2 está relacionado con la lepra tuberculoide (24). En una población de enfermos de Indonesia, se demostró una asociación entre el DR2 y el DQ1 con baciloscopias positivas, mientras que las negativas se asocian con el DQ3 (67).

La presencia de anticuerpos contra los epitopes TB 71 y TB 72 de la proteína de 38 KD del bacilo también se asocia

fuertemente con el DR2, lo que indica que la regulación de la respuesta está mediada por genes Ir ligados a la región DR (54, 67). En los chinos se describió asociación con A11 y B15, y el Cw3 está disminuido mientras que el B35 está elevado en el Norte de China (62). En otro estudio de pacientes Chinos se demostró un incremento significativo del B35 en pacientes con TB y también con la forma meníngea, con un aumento del B27 en la forma pulmonar. El A19 está disminuido lo cual sugiere que podría estar asociado a la resistencia (68). El B8 está incrementado en caucásicos (59, 61, 68) y el B5, B15 y DR5 lo está en negros americanos. En Indios y negros el DR6 está asociado negativamente, sugiriendo participación en la protección (59, 60, 68, 70). El A2 y B5 están asociados en Egipcios (66). En chinos de Hong Kong no se encontró ninguna asociación ni clase I ni con DR, aun cuando se buscó la segregación en familias (70).

En un estudio de Coreanos con el mismo padecimiento se observaron disminuidos el A33, B52 y B61 y aumentados el B8, B51, B54, B62 y Cw1; en esta población la susceptibilidad se relaciona con el DR1 y DR3 y la resistencia con DR5 y DR9 (66). En un estudio familiar en la India se encontró segregación de la enfermedad con DR2 y DQ1 (58) lo mismo que en Indonesia con un incremento del DQ3 en sanos, lo que sugiere que este gen DQ confiere protección (67). El único estudio hecho en mexicanos que viven en Estados Unidos es el de Cox y col (1982), en el que se señala que la susceptibilidad y la resistencia a la tuberculosis en mexicanos no parece relacionarse con los antígenos clase I (60), pero ellos no analizaron clase II.

La realización de este proyecto es muy importante porque en México existe un alta incidencia de tuberculosis en todas sus formas clínicas. En 1988 se informaron 16,573 casos de tuberculosis (6) y no hay ningún estudio genético en mestizos mexicanos que establezca si la enfermedad está condicionada genéticamente y si es así, cuales son los antígenos HLA que participan en la susceptibilidad al padecimiento.



### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis pulmonar es un problema de salud pública muy importante en los países en desarrollo incluyendo a toda América Latina y evidentemente a México. La enfermedad está asociada a la desnutrición y se atribuye a factores sociales, culturales, económicos y de hacinamiento. Dada la alta incidencia de tuberculosis pulmonar en nuestro país y el desconocimiento absoluto de las características genéticas de la enfermedad en mexicanos, se pretende analizar la relación de la enfermedad con los antígenos HLA y la participación de genes HLA en la capacidad de respuesta al PPD, para saber si existen genes Ir (de respuesta inmunológica) ligados al MHC. Si se haya algún antígeno asociado se calculará el riesgo relativo (RR) de adquirir la enfermedad cuando se es portador del marcador genético que predispone al padecimiento.

### IV. HIPOTESIS

Por la similitud que existe entre la lepra y la tuberculosis, en cuanto a los aspectos clínicos y a las características inmunológicas diversas, se postula que los genes del MHC deben jugar un papel importante como genes de susceptibilidad y de resistencia en la tuberculosis pulmonar, así como en sus diferentes formas clínicas. Además, dependiendo del patrón de antígenos HLA de cada individuo, habrá sujetos que sean respondedores o anérgicos al PPD, lo cual demuestra si la capacidad individual de respuesta ante la exposición a la micobacteria está condicionada genéticamente por el patrón HLA del huésped.

## V. OBJETIVOS

### 1.- OBJETIVO GENERAL

Conocer si existen factores de susceptibilidad genética ligados al MHC en la TBP en mexicanos y si la capacidad de la respuesta inmunológica celular específica, que es la responsable de la protección en la enfermedad, está condicionada por genes Ir o Is del MHC.

### 2.- OBJETIVOS PARTICULARES

2.1.- Tomar 100 muestras de sangre de sujetos sanos y 100 de enfermos con tuberculosis pulmonar diagnosticados por neumólogos expertos del Servicio de Neumología del Hospital General de México SSA. Todos los individuos incorporados al estudio pertenecen a la población mestiza mexicana.

2.2.- Tipificar para antígenos HLA clase I y clase II a todos los sujetos incorporados al estudio con el objeto de conocer la distribución de estos marcadores en la población sana y en la población enferma, así como en los subgrupos clínicos e inmunológicos. Así se determinará si existe o no asociación positiva (susceptibilidad) o negativa (protección) de algún antígeno HLA con la tuberculosis pulmonar en mexicanos.

3.3.- Evaluar la respuesta inmunológica celular tanto in vivo como in vitro al PPD en busca de los genes Ir o Is ligados al MHC de los cuales depende la capacidad de respuesta individual al antígeno específico (PPD).

2.4.- Efectuar un análisis estadístico para determinar la frecuencia antigénica para cada antígeno HLA, en los pacientes, en los testigos y en los subgrupos clínicos e inmunológicos

polares e intermedios de pacientes.

2.5.- Efectuar un análisis estadístico comparativo entre la población sana y enferma usando la  $\chi^2$  corregida por Yates, para saber si hay o no una desviación significativa en la frecuencia de algún antígeno HLA y establecer los factores genéticos ligados al MHC que están involucrados en la tuberculosis pulmonar y en los subgrupos de la enfermedad. En el caso de hallar asociación se calculará el riesgo relativo que es una medida del riesgo de adquirir la enfermedad cuando se es portador de dicho marcador.

2.6.- Calcular la FE que es una medida que sugiere cuanto de la enfermedad se debe al factor genético y en el caso de encontrar un antígeno significativamente disminuido se calculará la FP que es una medida relativa que indica cuanto de la protección se debe al marcador genético en cuestión.

2.7.- Establecer si la severidad del padecimiento o la expresión clínica de las diferentes formas de la tuberculosis pulmonar dependen del patrón HLA individual.

2.8.- Comparar los resultados con los de otros grupos étnicos, para conocer si el perfil genético de la enfermedad es igual en los mestizos mexicanos que en otras poblaciones.

## VI. MATERIALES Y EQUIPO

### 1) MATERIAL

Todo el material utilizado debe ser estéril.  
Tubos de vidrio de 13 x 150 mm con tapón  
Tubos Fisher para microcentrifuga de 1 ml  
Tubos para cultivo de plástico desechable de 12 x 75mm  
Pipetas graduadas de vidrio o plástico (5 y 10 ml.)  
Pipetas pasteur  
Jeringas de plástico desechables (1, 3, 5, 10, 20 ml).  
Gradillas  
Bulbos y perillas de seguridad  
Pipeteador automático (Jet Pipette, Robbins Sci.Co.). Mecheros  
Frascos de vidrio (50, 100 ml)  
Viales de vidrio con rosca  
Popotes de plástico  
Fibra de nylon  
Cajas petri  
Microjeringas de 50, 65 y 250 ul (Robbins Sci. Co.)  
Recipiente para complemento de 10 ml  
Placas de microcultivo de 96 pozos de fondo redondo  
Cubierta plástica adherible para la caja de cultivo  
Puntas de plástico desechables  
Cubreobjetos para cajas terasaki 50 X 75 mm.  
Papel filtro  
Filtros de fibra de vidrio para cosechador de microcultivo  
Filtros millipore de 0.22 y 0.45 um  
Trampa para vacío  
Pinzas, tijeras  
Microplacas Terasaki de 60 pozos para citotóxicidad.

### 2) EQUIPO

Balanza analítica y granataria  
Estufa seca a 37°C  
Cámaras de Newbauer  
Vortex -2 genie  
Contador de Centelleo líquido  
Microscopio invertido, American Optical BioStar  
Microscopio óptico Zeiss  
Centrifuga Beckman, modelo J-6B  
Centrifuga Fisher, modelo 59  
Potenciómetro, Beckman modelo 3550 Digital pH meter  
Incubadora de CO<sub>2</sub>.  
Campana de flujo laminar vertical  
Agitador para placas de cultivo (Titertek, Flow Laboratories).  
Micropipetas de una punta de 5 a 40 ul y de 40 a 200 ul.  
Micropipeta digital múltiple (12 canales) de 50 a 300 ul (Flow Laboratories, No. 77-715-00).  
Micropipeta digital múltiple (4 canales) de 5 a 50 ul (4Flow

(Laboratories, No. 77-710-00)  
Unidad de filtrado millipore con un litro de capacidad.  
Microcosechador automático  
Bomba de vacío

### 3) REACTIVOS

Alcohol

Aceite mineral

Complemento de conejo para linfocitos T

Complemento de conejo para linfocitos B (Pel-Freez, C-six o One - Lambda)

Sueros Anti-HLA

Azul de tripano

Eosina amarillenta al 5% :

Pesar 5 g de eosina amarillenta en 100 ml de agua ajustada a un pH de 7.2.

Solución de formol al 34% :

Poner 34 ml de formol a 66 ml de agua ajustada a un pH de 7.2

Agua tridestilada estéril

Heparina 1000 U/ml: (1,000,000 u (180 U/mg) SIGMA). Se pesan 550 mg de heparina y se disuelven en 100 ml de agua tridestilada. Se esteriliza por millipore usando un filtro de 0.22 u. Se distribuye en frascos estériles en alícuotas de 10 ml., se tapan con tapón de hule y retapa metálica y se guardan en refrigeración a 4 C hasta su uso.

Solución balanceada de Hanks:

Se hidrata el polvo con agua tridestilada y se afora a un litro, se ajusta a un pH de 7.2 y se esteriliza por millipore (0.22 u). Distribuir en frascos estériles de 100 ml y sellar con tapón de hule y retapa metálica. Guardar hasta su uso a 40C y en la oscuridad.

Solución de Hepes (SIGMA, No. H-3375) al 1M. pH 7.2:

Disolver 23g en 70 ml de agua tridestilada ajustar a pH 7.2 con NaOH 5N. Completar a 100 ml con agua tridestilada. Esterilizar en autoclave a 15 Lb (120 C).

Solución de Lymphoprep o Lymphopure con una densidad de 1.077 +/- 0.001 g/ml (20 C), osmolaridad 280 + 15 mOsm, pH :6.8 + 0.5 (NYCOMED Pharma AS, Oslo, Noruega).

Antibióticos:

Penicilina G sódica (ampolleta de 1,000,000 UI) con una concentración de 100 U/ml y Estreptomycin (ampolleta de 1 g) con una concentración de 100 ug/ml. Suspender el contenido de cada ampolleta en 5 ml. de agua tridestilada estéril.

Bicarbonato de sodio al 2%: Se disuelven 2 g de bicarbonato de sodio en 100 ml de agua tridestilada y se esteriliza 20 minutos a 15 Lb (120 C).

Suero de ternera fetal (STF) descomplementado: Se descongela el STF a temperatura ambiente y se pone a baño maría por media hora a 56°C.

Suero humano tipo AB

Medio RPMI 1640: Medir 950 ml de agua tridestilada en un matraz erlenmeyer. Anadir el contenido de un sobre de medio al agua,

agitar suavemente hasta que se disuelva por completo. Anadir 2 g de bicarbonato de sodio y aforar a 1000 ml. Ajustar el pH a 0.2 - 0.3 unidades por debajo del pH deseado ( el pH aumenta de 0.1 a 0.3 unidades después de la filtración). Usar NaOH o HCL IN para ajustarlo. Mantener perfectamente tapado el matraz hasta que se filtre. Esterilizar por millipore (0.22 u) distribuir en frascos estériles de 100 ml y sellar con tapón de hule y retapa metálica. Guardar hasta su uso a 4 C y protegerlo de la luz.

Glutamina: Hacer una solución 200 mM de glutamina. Pesar 2.927 g de glutamina. Disolver en 100 ml de agua tridestilada, esterilizar por filtro de millipore y distribuir en alícuotas de 1.5 ml en tubos de plástico estéril y congelar a -20°C hasta su uso.

Medio RPMI-1640 completo con 15% de STF: Se agregan a un matraz 0.4 ml de la mezcla de antibióticos, 1 ml de glutamina, 15 ml de suero de ternera fetal o suero AB inactivados. Si en el medio no viene integrado el hepes se adiciona a la mezcla 24 ml de solución de hepes y se afora con el medio RPMI simple a 100 ml.

Fitoheماغlutinina ( PHA-P, SIGMA No. L-8754) (50 mg): Se prepara una solución madre de 1 mg/ml diluyendo los 50 mg en 50 ml de agua tridestilada estéril y se distribuye en alícuotas de 1 ml que se almacenan a -70°C hasta su uso.

Derivado Proteico Purificado (PPD) de 50,000 UI/ml (Tuberculin Departament DK-2, 300 Copenague, Dinamarca).

Líquido de centelleo: Se pesan 4 g de 2,5 Difeniloxazol (PPO) y 50 mg (1,4 bis (2-(5-fenoloxazole))benceno (POPOP) y se mezclan en un litro de tolueno hasta asegurarse de que se haya formado una mezcla homogénea. Guardar en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Timidina tritiada (3H): El frasco original trae una concentración de 5 Ci/ml. Se diluye 1:10 adicionando 45 ml de medio RPMI simple; se distribuye en alícuotas de 10 ml y se guarda a -70°C hasta su uso. La concentración final es de 1 uCi en cada 10 ul de solución.

Todo el material utilizado debe ser estéril. Se trabaja en una campana de flujo laminar.

En el caso de este isótopo las precauciones no son tan estrictas pero la superficie del flujo debe estar recubierta de papel absorbente. El operador deberá usar guantes de hule desde el inicio del trabajo.

Después de su uso el material sólido, debe ser depositado en los contenedores para basura radioactiva, que deben tener una bolsa de plástico para recibir el material. Los líquidos radiactivos se desechan en frascos grandes de plástico. Todos los desechos radiactivos se entregan a los operadores del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, quienes periódicamente recojen la basura radiactiva.

Al terminar el operador debe lavarse las manos con los guantes exhaustivamente y finalmente sin ellos.

## VII. METODOS

Se seleccionaron 100 individuos aparentemente sanos pertenecientes a la población mestiza mexicana. Las muestras de sangre venosa de estos sujetos se obtuvieron del Banco de Sangre del Hospital de la Mujer S.S.A., del personal y de estudiantes de la Institución (INDRE). Se incluyeron un total de 100 pacientes con diagnóstico de TBP tipo III que fueron seleccionados por los DRs. Raúl Cicero y Francisco Navarro en el Servicio de Neumología del Hospital General de México S.S.A.. El diagnóstico se efectuó mediante los criterios internacionales y los pacientes se agruparon de acuerdo a la clasificación de Lenzini (11, 18, 19).

La enfermedad se confirmó por medios clínicos, radiológicos, bacteriológicos e inmunológicos. De los 100 pacientes 2 RR; 42 RI; 38 UI y 18 UU. Se tomaron 30 ml. de sangre de cada individuo que fueron procesados en el Departamento de Inmunogenética del INDRE, en donde se hizo la tipificación de antígenos HLA mediante la técnica de microlinfocitotoxicidad, así como la prueba de transformación blastoide con PHA la cual se usó como mitógeno inespecífico y el PPD como antígeno específico (71, 72, 73).

Se obtuvieron las frecuencias antigénicas y génicas de cada antígeno HLA para conocer la distribución de los productos clase I y clase II en la población sana y enferma. Se hizo un análisis estadístico comparativo de las frecuencias antigénicas de cada antígeno HLA entre la población sana y enferma usando la  $\chi^2$  corregida por Yates. Se calculó el riesgo relativo (RR), la FP y la FE. Se evaluó la respuesta celular al PPD y se buscó la

correlación con los antígenos HLA presentes en cada enfermo para saber si hay genes Ir o Is ligados al MHC.

A continuación se describen las técnicas utilizadas en este proyecto.

## 1. TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA CLASE I (A,B,C)Y CLASE II (DR y DQ) (41, 74).

### 1.1.- SEPARACION DE CELULAS MONONUCLEARES CON SOLUCION DE FICOLL-HYPAQUE

1.1.1.- Se toman 30 ml de sangre venosa con 0.6 ml de la heparina preparada. La sangre se diluye 1:2 con solución de Hanks normal. Se separan 20 ml para la tipificación y 10 ml para el cultivo celular.

1.1.2.- Se utilizan 5 tubos de ensaye de 13 x 100 mm y a cada uno se le adicionan 2.5 ml de solución de Lymphoprep o Lymphopure.

1.1.3.- La sangre se estratifica cuidadosamente sobre la solución de Lymphoprep o Lymphopure, distribuyendo los 40 ml de sangre diluida en los tubos.

1.1.4.- Se centrifugan los tubos a 1,500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

1.1.5.- Después de centrifugar, se aspiran los linfocitos que forman un anillo blanco sobre la interfase, auxiliándose de una pipeta Pasteur de vidrio. Se colocan las células en otro tubo que contenga 2 ml de solución de Hanks normal y se centrifugan a 1,200 rpm durante 10 minutos.

1.1.6.- Se decanta el sobrenadante y el paquete celular se resuspende y se distribuye en tubos Fisher. Se adiciona 1 ml de solución de Hanks normal y se centrifuga a 1000 g durante un minuto.



1.1.7.- Se eliminan plaquetas mediante 3 lavados consecutivos con Hanks normal centrifugando a 1000g durante un minuto, en la centrifuga Fisher.

1.1.8.- Se verifica en la camara de Newbauer que no haya plaquetas.

1.1.9.- Las células mononucleares se resuspenden en 1 ml de medio RPMI 1640 con 5% de suero de ternera fetal (STF) o suero humano AB. De aquí se separan  $2.6 \times 10^6$  células para el cultivo celular. El resto se usa para separar linfocitos T y B.

## 1.2 SEPARACION DE LOS LINFOCITOS T Y B POR COLUMNA DE NYLON (67)

1.2.1.- Preparación de la columna de nylon: Se pesan 70-90 mg de nylon Fenwal bien peinado y se sumerge en 5 ml de Hanks normal.

1.2.2.- Se corta un popote a la altura de 10 cm aproximadamente y se cierra a la flama en un ángulo de  $45^\circ$ .

1.2.3.- Se empaca la lana en el popote uniformemente y en forma laxa sin que llegue al final y se hace una horadación en la punta para permitir la salida de el liquido.

1.2.4.- Se lava la lana con RPMI al 5% con STF o con suero AB previamente calentado a  $37^\circ\text{C}$  y se incuba la columna en forma horizontal durante media hora a  $37^\circ\text{C}$ .

1.2.5.- Una vez pasado este tiempo se saca la columna y se elimina una parte del medio. Se pasan las células por la columna hasta que penetre a todo lo largo.

1.2.6.- Inmediatamente después se coloca la columna en forma horizontal y se agrega medio RPMI en el extremo abierto para evitar la evaporación.

1.2.7.- Se incuban los popotes con las células durante 30 minutos a 37 ° C en forma horizontal en una estufa de incubación.

1.2.8.- Se coloca la columna en un tubo de vidrio marcado como linfocitos T y se deja escurrir su contenido. Se lava varias veces con 8 - 10 ml de medio RPMI 1640 previamente calentado durante 30 minutos a 37 ° C, al cual se le adiciona un 5% de STF.

1.2.9.- Los linfocitos B quedan adheridos al nylon y se recuperan en otro tubo marcado como linfocitos B; la columna se exprime lavando con medio frío que contiene 0.5% de STF.

1.2.10.- Se centrifugan las células T y B a 1,500 rpm durante 5 minutos.

1.2.11.- Se desecha el sobrenadante y se resuspende el botón celular en 1 ml de medio RPMI 1640 ajustando las células T y B a  $2.5 \times 10^6$  células por ml y se procede a montar las microplacas para la tipificación. Si se utilizan al día siguiente lo recomendable es guardarlas a temperatura ambiente con suficiente medio.

### 1.3. PREPARACION DE LAS MICROPLACAS PARA TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA (41, 74)

1.3.1.- Se marcan las microplacas Terasaki para microlinfocitotoxicidad de la siguiente manera: 101, 102, 103, 104, 201 y 202. Las cuatro primeras se utilizan para colocar los antisueros específicos contra los loci A, B, y C; y las dos últimas para los antisueros de los loci DR, DQ y DP.

1.3.2.- Se agregan 3 ul de aceite mineral a cada uno de los micropozos de las placas.

1.3.3.- Se agrega 1 ul de antisuero contra las diversas

especificidades para los loci A, B, C, (que servirán para tipificar a los antígenos Clase I) y 1 ul de cada reactivo para determinar los antígenos de los loci DR, DQ, y DP (para tipificar a los antígenos Clase II) en cada uno de los pocitos correspondientes.

1.3.4.- En cada placa se incluye 1 ul de control negativo (Suero AB de varones no transfundidos) y 1 ul de control positivo (anticuerpo monoclonal anti-clase I, en las placas para A,B,C y 1 ul de anticuerpo monoclonal anti-clase II y un anti-linfocito B en las placas para DR, DQ y DP. Se utilizan reactivos pertenecientes al Banco de Sueros del Departamento de Inmunogénética que consiste de antisueros obtenidos localmente y anticuerpos monoclonales y antisueros que recibimos de otros laboratorios por intercambio internacional. Se montan placas con un total de 360 reactivos anti-HLA para identificar 20 antígenos del locus HLA-A; 48 del locus HLA-B; 9 del locus HLA-C; 20 del locus HLA-DR; 8 del locus HLA-DQ y 2 del locus HLA-DP.

1.3.5.- Se envuelve cada juego en papel aluminio y se conservan en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

1.3.6.- Se registran los antisueros en formatos especiales que sirven para anotar los resultados de cada individuo.

#### 1.4. TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA MEDIANTE LA TECNICA DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD (57).

1.4.1.- Se ajustan las células a  $2.5 \times 10^6$  con medio RPMI y se coloca 1 ul de linfocitos T en cada uno de los micropozos de las placas respectivas para clase I (loci A,B y C) y 1 ul de linfocitos B en las cajas con antisueros para clase II (DR, DQ, DP).

1.4.2.- Las microplacas se agitan con cuidado en un vortex para que los antisueros se mezclen bien con los linfocitos.

1.4.3.- Las microplacas para clase I se incuban con las células durante 30 minutos a 37 °C y las placas que contienen los reactivos para los antígenos clase II se incuban durante 1 hora a 37 °C.

1.4.4.- Pasado este tiempo, se agrega a cada pozo 5 ul de complemento de conejo. Para las placas para tipificar antígenos clase I se utiliza un complemento que se prepara y se titula localmente y para las placas clase II se usa un complemento comercial.

1.4.5.- Se agitan las microplacas en el vortex y se incuban con el complemento los linfocitos T durante 1 hora a temperatura ambiente y las células B se incuban durante 2 horas también a temperatura ambiente.

1.4.6.- Se agregan 5 ul de eosina al 5% ajustada a un pH de 7.2 - 7.4. Se incuban 5 minutos y se agregan 5 ul de formol ajustado a pH 7.2 - 7.4.

1.4.7.- Para leer se utiliza un microscopio invertido de contraste de fase a 250 aumentos. Se calcula el número de células vivas y muertas de la siguiente manera: las vivas se observan refringentes, pequeñas y convexas, mientras que los linfocitos muertos se ven opacos, grandes, oscuros y planos debido al daño provocado por la lisis del complemento y por la incorporación del colorante a las células.

1.4.8.- Los resultados se reajustan de la siguiente manera:

MORTALIDAD	RESULTADOS	ASIGNACION
0 - al 10 %	-	1
11 - al 20 %	+	2
21 - al 30 %	++	4
31 - al 80 %	+++	6
81 - al 100%	++++	8

## 2. CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES PARA TRANSFORMACION BLASTOIDE (73, 74)

El cultivo se lleva a cabo con células mononucleares totales y se trabaja en una campana de flujo laminar, todo en condiciones estériles.

2.1.- De los 30 ml de sangre, se toman 10 ml para cultivo. La sangre se diluye 1:2 con una solución de Hanks normal.

2.2.- Se estratifica sobre una solución de Lymphoprep o Lymphopure (Ficoll-Hypaque), y se centrifuga a 1,500 rpm durante media hora a temperatura ambiente.

2.3.- Se aspiran los mononucleares que forman el anillo blanco sobre la interfase; se colocan en otro tubo y se lavan 2 veces con solución de Hanks normal centrifugando durante 10 minutos a 1,200 rpm.

2.4.- El paquete celular se resuspende en 1 ml de medio RPMI 1640 completo y las células se ajustan a  $1 \times 10^6$ . Se calcula la viabilidad tomando una pequeña alícuota de células que se tinte con azul de tripano y se cuentan las células vivas y muertas

en la cámara de Newbauer. Se calcula el porcentaje de viabilidad y se ajustan de acuerdo a las células vivas.

2.5.- Para sembrar el cultivo se utiliza una microplaca estéril de 96 pozos con fondo redondo. Los ensayos se realizan por triplicado de la siguiente forma:

CONTROL NEGATIVO: 100 ul de células + 100 ul de medio RPMI

CONTROLES POSITIVOS:

CON PHA 10 ug: 100 ul de células + 100 ul de solución PHA (10ul de PHA de 1000 ug/ml + 90 ul de medio). La concentración final es de 10 ug/ml.

CON (PHA) 25 ug: 100 ul de células + 100 ul de solución PHA (25 ul de PHA de 1000 ug/ml + 75 de medio). La concentración final es de 25 ug/ml.

CON (PHA) 50 ug: 100 ul de células + 100 ul de solución PHA (50 ul de PHA de 1000 ug/ml + 50 ul de medio). La concentración final es de 50 ug/ml.

CULTIVO EXPERIMENTAL CON PPD

Para hacer el cultivo con el PPD se utilizó un PPD concentrado de 50,000 UI/ml, del cual se prepara una solución madre de 5,000 UI/ml en medio RPMI. A partir de está se hacen las siguientes diluciones con sus respectivas concentraciones: Dilución 1:10 (500 UI/ml), dilución 1:5 (1000 UI/ml) y dilución 1:3.3 (1,500 UI/ml).

Se monta el cultivo de la siguiente forma:

PPD 500 UI: 100 ul de células + 100 ul de PPD (500 UI/ml).

PPD 1000 UI: 100 ul de células + 100 ul de PPD (1000 UI/ml).

PPD 1500 UI: 100 ul de células + 100 ul de PPD (1,5000 UI/ml).

Se cubre la microplaca de cultivo con una película plástica para evitar la evaporación y con su tapa de plástico y se agita durante 5 minutos.

2.6.- Se incuban las células testigo y las que contienen a la PHA durante 72 horas y las que contienen al PPD durante 96 horas a 37 °C en una estufa con atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>.

2.7.- 24 horas antes de la cosecha se añade a cada pozo 1 uCi de timidina tritiada con una actividad específica de 6.5 (Ci/mmol), se agita y se incuban de 8 - 18 horas.

2.8.- El paso siguiente es la cosecha: se desprende la película plástica solamente de los pozos que se van a cosechar, auxiliándose de un bisturí para cortar la cubierta plástica.

2.9.- Se coloca un filtro de fibra de vidrio sobre el cosechador automático que se humedece con agua tridestilada. Se cierra el cosechador y se coloca el peine por el cual subirá el contenido de los pozos por vacío hasta que las células lleguen al filtro. Se lavan las células inyectando agua en los pozos unas 10 veces, teniendo cuidado de expulsar toda el agua. Se saca el filtro con unas pinzas y con mucho cuidado. Las tiras se secan a temperatura ambiente o a 70 °C durante 2 horas.

2.10.- Se colocan los segmentos de filtro que contienen las células en un vial de vidrio y se adicionan 8 ml de líquido de centelleo.

2.11.- Se cuenta la radioactividad en un contador de centelleo líquido, para evaluar el grado de transformación, el cual se mide por las cpm de la radioactividad que indican la cantidad de incorporación del nucleótido marcado al DNA. Mientras más altas sean las cpm mayor será la transformación blastoide, que indica

una gran síntesis del DNA.

2.12.- La transformación blastoide se calcula mediante el índice de transformación (IT): cpm del problema / cpm del testigo.

Se calcula la media de cada uno de los juegos de triplicados, siempre que las cantidades no difieran en más del 40% entre sí; aquellos valores que tengan una diferencia mayor se descartan. Los ensayos se hacen por triplicado debido a que hay que tener en cuenta que se trabaja con células que son sistemas biológicos en los que hay mucha variabilidad debido a la cinética del sistema.

### 3. ANALISIS ESTADISTICO

3.1.- El análisis estadístico de cada antígeno en una población abierta permite evaluar si hay diferencias significativas entre las poblaciones estudiadas. Las comparaciones se hacen para cada antígeno HLA entre la población sana y enferma. En este estudio se hicieron las siguientes evaluaciones estadísticas en los meztizos mexicanos: se calcularon las frecuencias antigénicas y génicas de acuerdo al método de Haldane para cada uno de los antígenos clase I y clase II estudiados en los testigos y pacientes así como en los subgrupos clínicos e inmunológicos polares e intermedios de los pacientes. Para esto se usa la siguiente fórmula (75):

$$p = 1 - \sqrt{1 - \lambda}$$

En donde A= es la Frecuencia antigénica, que se calcula en porcentaje y se divide entre 100 para tener números absolutos.

P= frecuencia génica (FG).



3.2.- Una vez obtenidas las frecuencias de los testigos, de los pacientes totales y de los subgrupos de los pacientes, se calcula la significancia estadística de las diferencias de las frecuencias de cada antígeno en comparación con las de la población sana. También se hace el análisis con cada subgrupo de la enfermedad para saber si hay o no una desviación significativa de las frecuencias de algún antígeno y establecer si alguno de ellos se asocia positiva o negativamente con la enfermedad. El análisis se realiza mediante la  $\chi^2$  corregida por Yates (49), cuya expresión matemática es la siguiente:

$$\chi^2 \text{ Yates} = \frac{(ad-bc \times N/2)^2}{(a+c)(b+d)(a+b)(c+d)N}$$

En donde:

a= número de pacientes + para el marcador  
 b= número de pacientes - para el marcador  
 c= número de testigos + para el marcador  
 d= número de testigos - para el marcador  
 N= número total de sujetos estudiados.

El valor de  $\chi^2$ , se busca en tablas adecuadas para obtener el valor de la probabilidad (p), tomando en cuenta los grados de libertad (N-1). En este caso será igual a 1, ya que se están comparando sólo dos poblaciones. El límite de significancia es  $p=0.05$ . El valor de p se multiplica por el número total de antígenos HLA estudiados para obtener la probabilidad corregida (pc).

3.3.- Riesgo relativo (RR) es una medida relativa, que indica la intensidad con la que se asocia un antígeno dado e implica la probabilidad que tiene un individuo sano portador del antígeno en cuestión de desarrollar la enfermedad.

El RR se calcula de acuerdo a la fórmula de Wolf (76):

$$RR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

En donde: a, b, c y d son igual que en la X<sup>2</sup>

3.4.- Fracción etiológica (FE), indica cuanto de la enfermedad se debe al marcador genético involucrado en la asociación. Mientras más se acerca a 1, más depende la susceptibilidad del factor genético. La FE, se calcula por el método de Bengtsson y Thomson de la siguiente forma (77):  $FE = \frac{(RR - 1) (hp)}{RR}$ ;  $hp = \frac{p+}{(p+) + (p-)}$

En donde: RR= Riesgo relativo  
p+= Pacientes + para el marcador  
p-= Pacientes - para el marcador

3.5.- Fracción preventiva (FP): La fórmula muestra en el caso de la presencia de un antígeno disminuido, cuanto de la protección se debe al marcador genético involucrado. Mientras más se acerca el valor a 1, más se relaciona el gen en cuestión con la protección. La FP se calcula de acuerdo a Bengtsson y Thomson (77).  $Fp = \frac{(1 - RR) (hp)}{RR(1 - hp) + (hp)}$

3.6.- Coeficiente de correlación (R): La R es útil para establecer la concordancia entre dos pruebas. En este caso se comparan los resultados obtenidos de las respuesta inmunológicas con PPD in vivo con los obtenidos in vitro. Se analiza la concordancia positiva de las dos pruebas (+,+); la concordancia negativa (-, -); la discordancia (-,+ y la discordancia (+,-). El coeficiente de correlación se calcula (78), auxiliándose del calculo de la X<sup>2</sup>:

$$X^2 = \frac{(ad - bc)^2 \times N}{(a+b) (c+d) (b+d) (a+c)}$$

Las correlaciones se calculan de acuerdo a una tabla de 2 x 2

	CORRELACIONES		
	<u>in vitro</u>	<u>in vivo</u>	
a	+	+	
b	+	-	$R = \frac{X^2}{N}$
c	-	+	N
d	-	-	

N= número total de muestras.

a, b, c, d= número total de individuos.

R= Coeficiente de coorelación

### VIII. RESULTADOS

Los resultados de este estudio muestran que los 100 pacientes incluidos con el diagnóstico indudable de tuberculosis pulmonar llenaban los criterios de la ALA. En el cuadro 5 se observa que de acuerdo a la clasificación de Lenzini el 18% son UU, 38% UI, 42% RI y el 2% son RR. Es muy importante señalar que como sólo hubo dos sujetos en el polo reactor, no es posible llegar a conclusiones con este número de pacientes, por lo que el análisis se hizo con los resultados obtenidos para los polos no reactores, los intermedios y para el grupo total de pacientes.

CUADRO 5

SUBGRUPOS DE PACIENTES DE ACUERDO A LA CLASIFICACION DE LENZINI

CLASIFICACION DE LENZINI	PACIENTES No. %
RR	2
RI	42
UI	38
UU	18
TOTAL	100

Con base a esta clasificación se agruparon a los pacientes de acuerdo a sus datos clínicos y radiológicos (cuadro 6 y 7). La enfermedad no tiene preferencia de edad pues el promedio es de  $X=39$  años con un rango de 15 a 80 años y no se observa ninguna tendencia en los subgrupos. Aunque no hay predisposición al sexo (43% son femeninos), una gran proporción de los RI son masculinos (66.7%). La mayoría tiene un periodo de evolución de hasta 1 año

(61%) y el 100% de los UU caen en este tiempo de evolución, mientras que en el resto de los subgrupos prácticamente la mitad evolucionan en 12 meses y la otra mitad en un periodo de 13 - 24 meses. El cultivo BAAR (Bacilo ácido- alcohol resistente) es positivo en un 88% de los casos y en donde menos se identifica es en los UU (66.7%). Sólo cinco pacientes tuvieron antecedentes familiares de la enfermedad, lo que sugiere que no hay agregación familiar.

CUADRO 6

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR

	UU N=18	UI N=38	RI N=42	RR N=2	TOTAL N=100
EDAD (X)	40.6	39.0	38.4	43.0	39.1
DS	+11.2	+13.5	+13.9	+8.5	+13.1
SEXO (%)	F= 61.1	F= 44.7	F= 33.3	F= 50.0	F= 43.0
EVOLUCION (%)					
0 - 12m	100.0	57.8	47.6	50.0	61.0
50.0	36.0				
25 - 48m	0	5.2	2.4	0	3.0
BAAR + (%)	66.7	100.0	85.7	100.0	88.0
ANT. FAM.	1.0	3.0	1.0	0.0	5.0

En donde m= meses; ANT. FAM.= antecedentes familiares de tuberculosis pulmonar.

El estudio radiológico (cuadro 7) muestra que los pacientes en el polo UU tienen lesiones pulmonares severas (miliar, caseosa, caseosa-cavitaria y algunos, fibrocaseosa). En el polo no-reactor intermedio UI ya no existe la forma miliar y van desde

la forma caseosa hasta la fibrocavitaria, nodular, pero la mayoría son fibrocaseosa, fibrocavitaria y caseosa. En cambio en la forma RI sólo hay lesiones cavitarias, fibrocaseosa-cavitaria, pero fundamentalmente fibronodulares (40.5%) y cavitaria nodular (26.2%) que son las formas menos malignas. El 28.6% tiene lesiones fibrosas o pleurales, que son las más benignas. Los dos RR presentaron lesiones fibronodulares.

CUADRO 7

ANALISIS RADIOLOGICO DE LOS PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR

RADIOGRAFIA	UU N=18 %	UI N=38 %	RI N=42 %	R N=2 %	TOTAL N=100 %
MILIAR	33.3	0	0	0	6.0
CASEOSA	50.0	13.2	0	0	14.0
CASEOSA-CAVITARIA	11.1	2.6	0	0	3.0
FIBROCASEOSA	5.6	31.6	0	0	13.0
CAVITARIA	0	2.6	2.4	0	2.0
FIBROCASEOSA-CAVITARIA	0	7.9	2.4	0	4.0
FIRONODULAR	0	2.6	40.5	100	20.0
FIBROSA	0	2.6	14.3	0	7.0
FIBROCAVITARIA	0	34.2	0	0	13.0
FIBROCAVITARIA-NODULAR	0	2.8	0	0	1.0
CAVITARIA-NODULAR	0	0	26.2	0	11.0
PLEURAL	0	0	14.3	0	6.0
TOTAL	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Los resultados de la prueba cutánea hecha con el PPD se compararon con los resultados de la respuesta celular in vitro (cuadro 8), el coeficiente de correlación entre las dos pruebas fue muy elevado ( $R=0.86$ ), lo cual demuestra que los datos obtenidos para la respuesta celular tanto in vivo como in vitro son muy confiables.

CUADRO 8

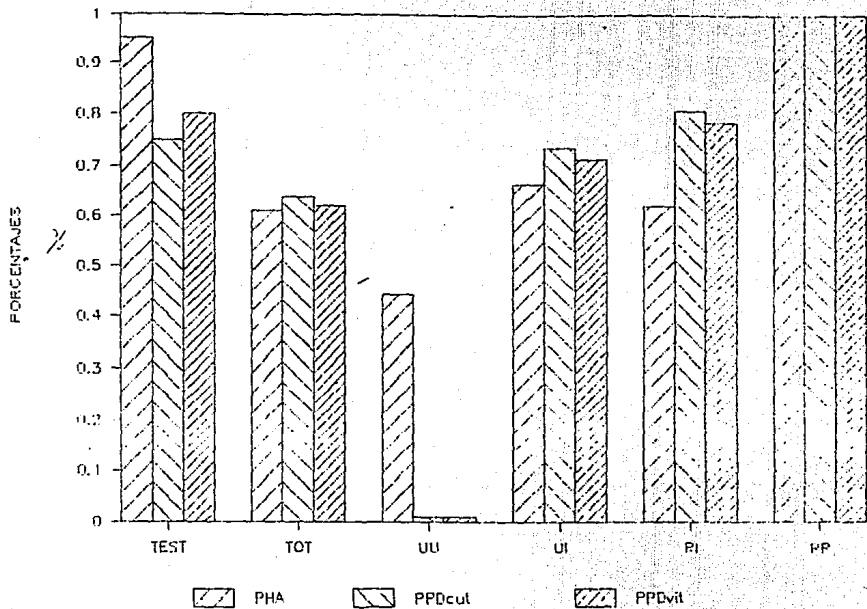
CORRELACION ENTRE LA RESPUESTA CELULAR IN VIVO E IN VITRO

R	PACIENTES (N)
PPD CUT+ PPD <u>IN VITRO</u> +	54
PPD CUT+ PPD <u>IN VITRO</u> -	2
PPD CUT- PPD <u>IN VITRO</u> +	4
PPD CUT- PPD <u>IN VITRO</u> -	30
TOTAL	90

$\chi^2$   
 $\chi^2 = 66.18 \quad R = 0.86$

En el cuadro 9 se muestran los resultados en el porcentaje de sujetos respondedores tanto al mitógeno (PHA) como al PPD tanto in vivo como in vitro lo cual se esquematiza en la gráfica 1. El 95% de los sanos tiene su capacidad de respuesta celular intacta ya que son respondedores a la PHA, mientras que entre los pacientes sólo responden el 64.3%. La respuesta celular específica es también elevada en la población aparentemente sana (75.5% in vivo y el 80% in vitro), muestra que el 65% de los pacientes responden in vivo y el 63% in vitro. La falla para inducir una respuesta celular se va acentuando hasta encontrar que los UU tienen una anergia específica total.

## RESPUESTA CELULAR EN LA TB PULMONAR





CUADRO 9

## RESPUESTA CELULAR DE LOS PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR

	PHA (%) N= 98	PPD (%) <u>IN VIVO</u> N= 100	PPD (%) <u>IN VITRO</u> N= 90
UU	44.4	0	0
UI	66.7	73.7	71.4
RI	62.0	80.9	78.4
RR	100.0	100.0	100.0
TESTIGOS	95.5	75.5	80.0

Con respecto al análisis genético de los antígenos HLA, las frecuencias para antígenos clase I (HLA-A, B, y C) y clase II (HLA-DR y DQ) en los pacientes totales, subgrupos clínicos y sujetos sanos se muestran en los cuadros 10 - 15. Las frecuencias antigénicas y génicas de los antígenos de clase I aparecen en los cuadros 10, 11 y 12 y los de clase II en los cuadros 13, 14 y 15. No se encontró ninguna asociación significativa con clase I al comparar los testigos contra los pacientes totales y contra los subgrupos clínicos del padecimiento (cuadro 10 - 12). En los antígenos HLA-DR y HLA-DQ se encontraron las siguientes diferencias que se pueden ver en los cuadros 13 - 15 y que también se esquematizan en el cuadro 16. En el grupo total de pacientes se observa un incremento significativo del DR2 ( $\chi^2 = 7.17$ ,  $p=0.004$ ,  $pc=0.05$ ) y aunque el subtipo DR15 tiene una  $\chi^2 = 3.56$ ,  $p=0.05$ , es decir que se encuentra en el límite de la significancia y ésta se pierde al corregir

por el número de comparaciones hechas. La asociación con el DR2 persiste en los UI ( $X^2=5.17$ ,  $p=0.01$ ) y en los UU ( $X^2=4.26$ ,  $p=0.02$ ), pero la asociación DR15 desaparece en los subgrupos RI ( $X^2=1.66$ ,  $p=NS$ ); UI ( $X^2=1.07$ ,  $p=NS$ ). El RR para el DR2 es 2.5 en los totales y en los subgrupos es de 2.1, 2.8 y 3.4 en los RI, UI, y UU respectivamente.

El DQ1 y su subtipo DQ6 muestra una asociación significativa que se pierde al corregir la p (DQ1  $X^2=4.11$ ,  $p=0.02$ ,  $pc=NS$ ; DQ6  $X^2=3.53$ ,  $p=0.05$ ,  $pc=NS$ ) en el grupo total. Dicha asociación no aparece en los subgrupos y el valor de RR es muy pequeño (DQ1  $RR=2.0$  y DQ6  $RR=1.9$ ).

El DR11 se encontró significativamente disminuido en el grupo total ya que la frecuencia en pacientes es de 5% vs 21% en los sanos ( $X^2=12.78$ ,  $p=0.0003$ ,  $pc=0.04$ ,  $RR=0.20$ ). Al analizar los subgrupos se ve que la asociación más franca es en el grupo UU (con una frecuencia de 18.0%) con una  $X^2=6.68$ ,  $p=0.009$  y  $pc=0.05$ . En el cuadro 17 se observa que la fracción etiológica (FE) del DR2 es de 0.22 en los totales y ésta se intensifica en el grupo UU (0.31) aunque la del subtipo DR15 es despreciable. La fracción preventiva (FP) del DR11 es de 0.24 en los totales pero se va intensificando en los subgrupos hasta llegar a 1 en los UU.

Es evidente que el DR2 es un gen que confiere susceptibilidad a la TBP y el DR11 ofrece protección a la enfermedad.

## CUADRO 10

### FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-A EN LA POBLACION MEXICANA SANA Y CON TUBERCULOSIS PULMONAR Y EN LOS SUBGRUPOS DE PACIENTES

HLA-A	TESTIGOS		PACIENTES *		UU		UI		RI		RR	
	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %
A1	10.00	5.13	15.00	7.80	16.70	8.70	7.90	4.03	21.40	11.30	0.00	0.00
A2	58.00	35.20	50.00	36.00	66.70	42.30	57.90	35.10	54.80	32.80	10.00	1.00
A3	9.00	4.61	9.00	4.61	11.20	5.77	7.90	4.03	9.60	4.92	0.00	0.00
A9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A11	1.00	0.50	1.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	2.40	1.21	0.00	0.00
A19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A23	2.00	1.01	6.00	3.05	5.60	2.80	7.90	4.03	4.80	2.43	0.00	0.00
A24	28.00	15.20	29.00	15.70	44.50	25.50	31.60	17.30	21.40	11.30	0.00	0.00
A25	1.00	0.50	4.00	2.02	0.00	0.00	5.30	2.70	4.80	2.42	0.00	0.00
A26	10.00	5.13	4.00	12.30	0.00	0.00	5.20	2.63	4.80	2.42	0.00	0.00
A28	19.00	10.00	23.00	2.02	22.30	11.80	21.00	11.10	23.80	12.71	50.00	29.30

UU= No reactivos

\*= Pacientes totales

UI= No reactivos intermedios

RI= Reactivos intermedios

RR= Reactivos

## CUADRO 10\*\*

### FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-A EN LA POBLACION MEXICANA SANA Y CON TUBERCULOSIS PULMONAR Y EN LOS SUBGRUPOS DE PACIENTES

A29	8.00	4.08	4.00	3.56	5.60	2.84	0.00	0.00	7.20	3.67	0.00	0.00
A30	9.00	4.61	7.00	6.19	0.00	0.00	10.50	5.40	4.80	2.43	50.00	29.30
A31	12.00	6.19	12.00	2.02	11.10	5.71	10.50	5.40	14.30	7.43	0.00	0.00
A32	2.00	1.01	4.00	5.13	5.60	2.84	5.30	2.70	2.40	1.21	0.00	0.00
A33	5.00	2.53	10.00	1.01	5.60	2.84	13.20	6.83	9.50	4.87	0.00	0.00
A34	1.00	0.50	2.00	1.01	0.00	0.00	2.60	1.31	2.40	1.21	0.00	0.00
A36	2.00	1.01	2.00	1.01	0.00	0.00	5.30	2.69	0.00	0.00	0.00	0.00
A43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A68	6.00	3.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A69	6.00	3.05	1.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	2.40	1.21	0.00	0.00
A74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
AX	10.00	3.23	8.00	-5.40	5.60	2.84	7.90	4.03	9.50	4.87	0.00	0.00

UU= No reactores

UI= No reactores intermedios

RI= Reactores intermedios

RR= Reactores

\*= Pacientes totales

## CUADRO 11

### FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-B EN LA POBLACION MEXICANA SANA Y CON TUBERCULOSIS PULMONAR Y EN LOS SUBGRUPOS DE PACIENTES

HLA-B	TESTIGOS		PACIENTES*		UU		UI		RI		RR	
	F. AG. %	F. G. %	F. AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %
B5	1.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B7	12.00	6.19	8.00	4.08	5.60	2.84	2.60	1.30	14.3	7.43	0.00	0.00
B8	4.00	2.02	6.00	3.05	5.60	2.84	7.90	4.03	4.80	2.43	0.00	0.00
B12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B13	8.00	4.08	7.00	3.56	5.60	2.84	10.50	5.40	4.80	2.43	0.00	0.00
B14	9.00	4.61	1.00	0.50	5.60	2.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B16	2.00	1.01	1.00	0.50	0.00	0.00	2.60	1.31	0.00	0.00	0.00	0.00
B17	0.00	0.00	1.00	0.50	0.00	0.00	2.60	1.31	0.00	0.00	0.00	0.00
B18	2.00	1.01	3.00	1.51	0.00	0.00	2.60	1.31	4.80	2.43	0.00	0.00
B21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B27	6.00	3.05	6.00	3.05	5.60	2.84	13.20	6.81	0.00	0.00	0.00	0.00
B35	29.00	15.74	19.00	10.00	22.30	11.81	21.10	11.20	16.70	8.71	0.00	0.00
B37	3.00	1.51	1.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	2.40	1.21	0.00	0.00
B38	5.00	2.53	10.00	5.13	16.70	8.73	5.20	2.63	11.90	6.14	0.00	0.00
B39	18.00	9.45	20.00	10.60	44.50	25.50	15.80	8.24	14.30	7.43	0.00	0.00
B40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B41	3.00	1.51	1.00	0.50	0.00	0.00	2.60	1.31	0.00	0.00	0.00	0.00

UU= No reactores

\*= Pacientes totales

UI= No-reactores intermedios

RI= Reactores intermedios

RR= Reactores

## CUADRO 11 \*\*

### FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-B EN LA POBLACION MEXICANA SANA Y CON TUBERCULOSIS PULMONAR Y EN LOS SUBGRUPOS DE PACIENTES

HLA-B	TESTIGOS		PACIENTES *		UU		UI		RI		RR	
	F.AG.	F.G	F.AG	F.G	F.AG.	F.G	F.AG	F.G	F.AG.	F.G	F.AG.	F.G
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
B42	2.00	1.01	3.00	1.51	5.60	2.84	5.20	2.63	0.00	0.00	0.00	0.00
B44	15.00	7.80	16.00	8.35	5.60	2.84	18.50	9.72	14.20	7.37	100	1.00
B45	3.00	1.51	3.00	1.51	0.00	0.00	2.60	1.30	4.80	2.43	0.00	0.00
B46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B47	1.00	0.50	3.00	1.51	0.00	0.00	5.30	2.69	2.40	1.21	0.00	0.00
B48	5.00	2.53	2.00	1.01	0.00	0.00	0.00	0.00	4.80	2.43	0.00	0.00
B49	0.00	0.00	3.00	1.51	5.60	2.84	2.60	1.31	2.40	1.21	0.00	0.00
B50	3.00	1.51	2.00	1.01	0.00	0.00	0.00	0.00	4.80	2.43	0.00	0.00
B51	11.00	5.66	22.00	11.70	22.30	11.80	23.70	12.65	21.40	11.40	0.00	0.00
B52	7.00	3.56	4.00	2.02	0.00	0.00	7.90	4.03	0.00	0.00	50.0	29.3
B53	5.00	2.53	3.00	1.51	5.60	2.84	0.00	0.00	4.80	2.43	0.00	0.00
B54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B55	4.00	2.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B56	0.00	0.00	3.00	1.51	5.60	2.84	0.00	0.00	4.80	2.43	0.00	0.00
B57	4.00	2.02	5.00	2.53	0.00	0.00	0.00	0.00	11.90	6.14	0.00	0.00
B58	1.00	0.50	2.00	1.01	5.60	2.84	2.60	1.30	0.00	0.00	0.00	0.00
B59	1.00	0.50	2.00	1.01	0.00	0.00	0.00	0.00	4.80	2.43	0.00	0.00
B60	5.00	2.53	12.0	6.20	11.11	5.71	10.50	5.41	14.30	7.43	0.00	0.00
B61	4.00	2.02	5.00	2.53	5.60	2.84	7.90	4.03	0.00	0.00	50.00	29.3

UU= No reactivos

UI= No reactivos intermedios

RI= Reactores

RR= Reactores

\*= Pacientes totales

\*\*= Continuación del cuadro 11

## CUADRO 11\*\*

### FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-B EN LA POBLACION MEXICANA SANA Y CON TUBERCULOSIS PULMONAR Y EN LOS SUBGRUPOS DE PACIENTES

HLA-B	TESTIGOS		PACIENTES*		UU		UI		RI		RR	
	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %
B62	7.00	3.56	6.00	3.05	5.60	2.84	5.20	2.63	7.10	3.62	0.00	0.00
B63	0.00	0.00	5.00	2.53	0.00	0.00	5.30	2.69	7.10	3.62	0.00	0.00
B64	2.00	1.01	1.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	2.40	1.21	0.00	0.00
B65	2.00	1.01	2.00	1.01	0.00	0.00	5.30	2.69	0.00	0.00	0.00	0.00
B67	1.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B70	0.00	0.00	1.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	2.40	1.21	0.00	0.00
B71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B73	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BX	15.00	4.51	11.00	2.57	11.10	5.71	10.50	5.41	11.90	6.14	0.00	0.00
Bw4	63.00	39.17	76.00	51.01	72.20	27.40	81.60	57.10	71.40	46.52	100	1.00
Bw6	104.00	80.00	84.00	60.00	100	1.00	81.60	57.10	81.00	56.41	50.00	29.30
BwX	33.00	19.17	41.00	9.78	27.80	15.03	36.80	20.50	47.60	27.62	50.00	29.30

UU= No reactivos

UI= No reactivos intermedios

RI= Reactivos intermedios

RR= Reactivos

\*= Pacientes totales

\*\*= Continuación del cuadro 11

## CUADRO 12

### FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-C EN LA POBLACION MEXICANA SANA Y CON TUBERCULOSIS PULMONAR Y EN LOS SUBGRUPOS DE PACIENTES

HLA-C	TESTIGOS		PACIENTES*		UU		UI		RI		RR	
	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %
Cw1	18.00	9.45	25.00	13.40	22.20	11.80	28.90	15.68	23.80	12.71	0.00	0.00
Cw2	16.00	8.35	14.00	7.26	5.60	2.80	13.10	6.80	16.70	8.73	50.00	29.30
Cw3	14.00	7.26	27.00	14.56	16.70	8.73	18.50	9.72	38.10	21.32	50.00	29.30
Cw4	42.00	23.84	37.00	20.63	22.20	11.80	42.10	23.91	35.70	19.81	100	1.00
Cw5	10.00	5.13	18.00	9.45	16.70	8.73	21.10	11.17	16.60	8.70	0.00	0.00
Cw6	6.00	3.05	2.00	1.01	5.60	2.84	2.60	1.31	0.00	0.00	0.00	0.00
Cw7	48.00	27.89	34.00	18.76	55.50	32.29	39.40	22.15	21.40	11.34	0.00	0.00
Cw8	6.00	3.05	3.00	1.51	5.60	2.80	2.60	1.31	2.40	1.21	0.00	0.00
Cw9	6.00	3.05	6.00	3.05	11.10	5.71	2.60	1.31	7.20	3.67	0.00	0.00
Cw10	2.00	1.01	10.00	5.13	16.70	8.73	13.20	6.83	4.80	2.43	0.00	0.00
CX	33.00	8.53	24.00	5.25	22.20	11.80	15.80	8.24	33.30	12.33	0.00	0.00

UU= No reactivos

UI= No reactivos intermedios

RI= Reactivos intermedios

RR= Reactivos

\*= Pacientes totales



## CUADRO 13

### FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-DR EN LA POBLACION MEXICANA SANA Y CON TUBERCULOSIS PULMONAR Y EN LOS SUBGRUPOS DE PACIENTES

HLA-DR	TESTIGOS		PACIENTES*		UU		UI		RI		RR	
	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %	F.AG. %	F.G. %
DR1	13.00	6.73	19.00	10.00	11.10	5.71	28.90	15.68	14.30	7.43	0.00	0.00
DR2	12.00	6.19	18.00	9.45	16.70	8.73	21.10	11.17	16.70	8.73	0.00	0.00
DR3	11.00	5.66	13.00	6.73	0.00	0.00	13.20	6.83	19.10	10.06	0.00	0.00
DR4	29.00	15.74	28.00	15.15	27.80	15.03	21.10	11.17	35.80	19.88	0.00	0.00
DR5	8.00	4.08	4.00	2.02	5.60	2.84	0.00	0.00	7.20	3.67	0.00	0.00
DR6	3.00	1.51	2.00	1.01	0.00	0.00	2.60	1.31	2.40	1.21	0.00	0.00
DR7	17.00	8.90	14.00	7.26	16.70	8.73	13.20	6.83	14.30	7.43	0.00	0.00
DR8	18.00	9.45	17.00	8.90	22.23	11.81	10.60	5.50	16.60	8.68	100	1.00
DR9	15.00	7.80	11.00	5.66	11.20	5.77	7.90	4.03	14.30	7.43	0.00	0.00
DR10	2.00	1.01	1.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	2.40	1.21	0.00	0.00
DR11	21.00	11.12	5.00	2.53	0.00	0.00	5.20	2.63	7.10	3.62	0.00	0.00
DR12	7.00	3.56	9.00	4.61	11.20	5.77	10.53	5.41	7.10	3.62	0.00	0.00
DR13	12.00	6.19	13.00	6.73	22.30	11.85	15.80	8.24	7.10	3.62	0.00	0.00
DR14	8.00	4.08	6.00	3.05	5.60	2.84	5.30	2.70	4.80	2.43	50.00	29.30
DR15	6.00	3.05	14.00	7.26	16.70	8.73	13.20	6.83	14.30	7.43	0.00	0.00
DR16	1.00	0.50	5.00	2.53	11.10	5.71	5.30	2.70	2.40	1.21	0.00	0.00
DR17	2.00	1.01	6.00	3.05	0.00	0.00	10.50	5.41	2.40	1.21	50.00	29.30
DR18	6.00	3.05	13.00	6.73	22.20	11.80	10.50	5.41	11.90	6.14	0.00	0.00
DRX	9.00	0.38	2.00	-3.15	0.00	0.00	5.30	2.70	0.00	0.00	0.00	0.00
DR52	84.00	60.00	74.00	49.01	77.80	52.88	65.80	41.52	78.60	53.74	100	1.00
DR53	56.00	33.67	48.00	27.89	55.50	33.30	36.84	20.53	57.20	34.58	0.00	0.00

UU= No reactores

\*= Pacientes totales

UI= No reactores intermedios

RI= Reactores intermedios

RR= Reactores

## CUADRO 14

### FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-DQ EN LA POBLACION MEXICANA SANA Y CON TUBERCULOSIS PULMONAR Y EN LOS SUBGRUPOS DE PACIENTES

HLA-DQ	TESTIGO		PACIENTES *		U U		U I		R I		R I	
	F.A.G. %	F.G. %	F.A.G. %	F.G. %	F.A.G. %	F.G. %	F.A.G. %	F.G. %	F.A.G. %	F.G. %	F.A.G. %	F.G. %
DQ1	29.00	15.74	24.00	12.82	11.10	5.71	23.70	12.65	28.60	15.50	50.00	29.30
DQ2	27.00	14.56	29.00	15.74	27.80	15.03	26.40	14.21	30.90	16.87	50.00	29.30
DQ3	32.00	17.54	24.00	12.82	22.30	11.85	18.50	9.72	28.50	15.44	50.00	29.30
DQ4	12.00	6.19	23.00	12.25	38.90	21.83	23.67	12.65	14.20	7.37	50.00	29.30
DQ5	13.00	6.73	19.00	10.00	22.20	11.81	23.67	12.65	14.30	7.43	0.00	0.00
DQ6	22.00	11.68	35.00	19.38	44.40	25.44	29.00	15.74	38.00	21.26	0.00	0.00
DQ7	32.00	17.54	23.00	12.25	27.80	15.03	23.70	12.65	21.40	11.34	0.00	0.00
DQ8	5.00	2.53	2.00	1.01	0.00	0.00	2.60	1.31	2.40	1.21	0.00	0.00
DQ9	6.00	3.05	3.00	1.51	5.60	2.84	0.00	0.00	4.80	2.43	0.00	0.00
DQX	22.00	4.45	18.00	2.22	0.00	0.00	28.90	15.68	16.70	8.73	0.00	0.00

UU= No reactores

\*= Pacientes totales

UI= No reactores intermedios

RI= Reactores intermedios

RR= Reactores

## CUADRO 15

### FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-DP EN LA POBLACION MEXICANA SANA Y CON TUBERCULOSIS PULMONAR Y EN LOS SUBGRUPOS DE PACIENTES

HLA-DP	TESTIGOS		PACIENTES *		U U		U I		R I		RR	
	F.A.G. %	F.G. %	F.A.G. %	F.G. %	F.A.G. %	F.G. %	F.A.G. %	F.G. %	F.A.G. %	F.G. %	F.A.G. %	F.G. %
DP1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP3	10.00	5.13	16.16	8.44	22.20	11.80	21.10	11.17	9.50	4.87	0.00	0.00
DP4	7.00	3.56	22.22	11.81	33.30	18.33	21.10	11.17	16.70	25.43	50.00	29.30
DP5	0.00	0.00	1.01	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DPX	183.00	91.30	161.60	79.25	144.40	33.66	157.90	23.91	171.40	15.48	100.00	1.00

UU= No reactivos

UI= No reactivos intermedios

RI= Reactivos intermedios

RR= Reactivos

\*= Pacientes totales



CUADRO 17

FRACCION ETIOLOGICA (FE) Y FRACCION PREVENTIVA (FP) DE LOS ANTIGENOS ASOCIADOS A LA TUBERCULOSIS PULMONAR EN MEXICANOS

FE	TOTALES	RI	UI	UU
DR2	0.22	0.18	0.25	0.31
DR15	0.08	0.09	0.08	0.11
FP				
DR11	0.24	0.15	0.17	1.00

En el cuadro 18 se muestra la relación entre la capacidad de respuesta específica en los pacientes y el DR2. Los resultados están expresados para las respuestas in vivo e in vitro. Los individuos no respondedores son DR2 positivos (52.8% PPD- vs 28.1% PPD+);  $\chi^2 = 6.01$ ,  $p = 0.009$ ). El DR2 es un gen Is además de ser un gen de susceptibilidad, pues la falla en la capacidad de respuesta celular específica depende en parte del DR2.

CUADRO 18

GEN Is LIGADO AL HLA-DR2 EN LA RESPUESTA CELULAR  
A M. tuberculosis

RESP CELULAR	DR2+	DR2-	TOTALES	
<u>IN VIVO</u>				
PPD+	18	46	64	
PPD-	19	17	36	
<u>IN VITRO</u>				
PPD+	16	40	56	
PPD-	19	15	34	
<u>IN VIVO</u>	PPD+ (%)	PPD-(%)	X <sup>2</sup>	P
	28.1	52.8	6.01	0.009
<u>IN VITRO</u>	28.6	55.0	7.28	0.004

## IX. DISCUSION

Este es el primer trabajo que se hace en tuberculosis pulmonar en mestizos mexicanos y en el que se busca la participación de los genes del sistema HLA, como se ha hecho para otros grupos étnicos. El sistema HLA, es de gran interés no sólo para conocer los factores genéticos involucrados en la TBP, sino también para conocer si hay alguna influencia genética en la severidad del padecimiento lo cual fue posible analizar, ya que se incorporaron a los pacientes en los diferentes subgrupos de la clasificación de Lenzini. Además, dado que existen datos evidentes de la presencia de genes Ir e Is ligados al MHC (50, 56, 57, 79, 80, 81) tanto en la lepra como en la tuberculosis pulmonar, se consideró importante identificar a los genes que determinan la capacidad de respuesta inmunológica específica.

De los 100 pacientes es claro que la mayoría caen en los polos intermedios (80%), probablemente en parte porque es en esa etapa clínica en la que se dan cuenta de que la enfermedad empieza a agravarse y por eso acuden al médico. El que sólo haya habido 18% de UU tal vez es muy sugestivo de que la genética juega un papel importante para que sólo ciertos individuos hagan la forma más severa del padecimiento. También es importante enfatizar que aunque los 2 RR se incluyen en el análisis del grupo total, no es posible manejarlos como un subgrupo independiente porque dos casos no son representativos en ninguna circunstancia (cuadro 5).

Desde el punto de vista clínico es claro, de los cuadros 6 y 7, que la tuberculosis en México tiene las mismas características que se han descrito en todas las poblaciones (57, 58, 60, 62, 63,

64, 65, 67, 69). Con respecto a la edad no existe predominio (cuadro 6), ya que la enfermedad se observa en cualquier grupo etario. El paciente más joven es de 15 y el mayor de 74 con un  $X=39.1$  años  $DS=+13.1$ . Tampoco difiere la edad en ninguno de los subgrupos, de modo que a cualquier edad se pueden desarrollar todas las formas clínicas. La distribución entre hombres y mujeres es prácticamente igual (cuadro 6) pero llama la atención que hay una tendencia en los UU al sexo femenino (61.1%) mientras que el 66.7% de los RI son hombres. Esto podría deberse simplemente a que el tamaño de la muestra en cada subgrupo no es muy grande y puede distorsionar la realidad, o a que ciertos factores hormonales puedan incidir y actuar en forma sinérgica. Valga señalar que en la literatura no hay mención de que el sexo tenga alguna importancia en la manifestación de la TBP (57, 68).

Los estudios radiológicos (cuadro 7) demuestran que los pacientes en el polo no reactor (UU) se caracterizan por una rápida difusión de las lesiones que son las más severas (miliar, caseosa, caseosa-cavitaria y sólo algunos con lesiones fibrocaseosas (5.6%)). El resto de los pacientes no desarrollan la forma miliar lo cual coincide con lo informado en la literatura, por tanto siendo ésta más grave aparece sólo en los UU (10). En los UI aunque no existe esta forma, la distribución incluye desde la caseosa (13.2%) hasta la fibrocavitaria-nodular (2.8%), pero el 31.6% manifiestan lesiones fibrocaseosas, que todavía son severas y el 34.2% fibrocavitarias, lo que indica como en otros estudios (62, 67), que no hay una inmunosupresión total. Entre los RI, cuya respuesta específica es más eficiente (gráfica 1), sólo aparecen lesiones fibronodulares (40.5%) que



son las más benignas, cavitarias nodulares (26.2%), fibrosas (14.3%) y pleurales (14.3%) y un pequeño porcentaje con lesiones cavitarias y fibrocavarias-cavitarias.

Los hallazgos radiológicos corren paralelos con la respuesta inmunológica pues en la gráfica 1 se observa con toda claridad que la anergia específica es total en los UU, mientras que en los UI hay un 75% de enfermos con una respuesta inmunológica activa al PPD y en los RI un 80%. Los dos pacientes RR tienen una buena respuesta específica y sus lesiones son fibronodulares, que también son benignas. Estos resultados coinciden con los hallazgos clínicos de otros estudios como el de Lenzini (10), Thomas (82), Zervas (63), (2) y otros en los que las imágenes radiológicas que se observan van aunadas a la respuesta contra antígeno específico (cuadro 9).

La respuesta celular inespecífica a la PHA también se halla alterada (cuadro 9) en los que casi la totalidad de los sanos (95.5%) responden y el 80% responden eficientemente al PPD, debido a que en algún momento estuvieron en contacto con el bacilo, desarrollaron una primo-infección y por lo tanto montaron una buena respuesta específica que culmina en protección en contra de la micobacteria. Es razonable que en México y en países similares, en los que la enfermedad no se ha erradicado y en donde los problemas de hacinamiento, falta de higiene y condiciones económicas deficientes aún son el marco de la población, se presente un porcentaje tan alto de sujetos aparentemente sanos positivos al PPD. En cambio en Estados Unidos y Europa donde la enfermedad prácticamente no existe ni tampoco hay programas de vacunación, la mayor parte de la población es

negativa a este antígeno específico (1, 6, 7).

El espectro clínico e inmunológico en la TBP demuestra que la respuesta celular está importantemente involucrada en la protección a la enfermedad y que al igual que la lepra (24) el polo no reactor se asocia a una respuesta deficiente de los linfocitos T, con presencia de anticuerpos específicos que pueden llegar a formar complejos inmunes que provoquen un cuadro clínico más severo, mientras que a medida que se acerca la expresión del padecimiento al polo reactor, la respuesta de las células T es más eficiente, hay ausencia de anticuerpos y la respuesta a los medicamentos es más eficaz (24, 56, 79, 81, 82). En este sentido valga mencionar que el método de transformación blastoide para evaluar la respuesta celular in vitro resultó ser muy confiable y efectivo, ya que de los resultados del cuadro 8 se desprende que la correlación entre las pruebas cutánea e in vitro es muy alta (0.86). Sólo hubo 6 discrepancias: 4 pacientes dieron una respuesta negativa in vivo, y positiva in vitro. Esto posiblemente se deba a que en un sistema biológico en el que se evalúa la respuesta celular mediante una prueba cutánea con el PPD de 2 U, como se hizo aquí, se pueden escapar algunos individuos que aunque si sean reactores, tienen un número menor de linfocitos con receptores específicos al PPD y por lo tanto no se logran identificar. En la prueba in vitro en cambio, se usaron tres concentraciones que abarcan hasta 1,500 U/ml. Las otras dos discrepancias, posiblemente fueron verdaderos errores técnicos, ya que fueron positivos en la prueba cutánea y negativos in vitro esto significa que la confiabilidad de las

pruebas es muy alta y que la sensibilidad in vitro es mayor que la de la prueba in vivo.

Pasando a los aspectos genéticos de la TBP como ya se mencionó, la predisposición genética fue sugerida desde 1943 por la prevalencia de la enfermedad en ciertos grupos étnicos (57, 58, 60, 62, 70, 66). En el presente estudio no se encontró ninguna desviación significativa en los antígenos de clase I (loci A, B, C), resultados que concuerdan con los de Cox y Col. para México-americanos con TBP (60). En algunos estudios se sugiere una asociación con diferentes antígenos clase I como en chinos con A11 y B15 (62); en coreanos con B8, B51, B54, B62 y Cw1 (66); en negros de Estados Unidos con B5 y B15 (66); en chinos con B35 (68, 69); en Egipcios con B5 (66) y en Caucasoides con B8 (60, 62, 70). Es muy posible que estas asociaciones, en general débiles, se deban a los siguientes factores: las asociaciones no pudieron confirmarse en otros grupos y por lo tanto no son reales; el número de pacientes y sanos era inadecuado; la selección clínica de los pacientes no cumplía con los criterios internacionales; problemas metodológicos o de análisis estadísticos; o el grupo testigo que se usó para comparar no pertenecía al mismo grupo étnico que el de los pacientes.

Los resultados de este estudio muestran que hay una asociación clara con antígenos de la región de clase II. El DR2, incluyendo a sus subtipos DR15 y DR16 muestran una frecuencia antigénica incrementada en los pacientes totales en relación a los sujetos sanos (37% vs 12%) (cuadro 13) con una  $X^2 = 7.17$  y una  $p = 0.004$  (cuadro 16) que a pesar de que se corrigió por el número

de comparaciones hechas, la significancia persiste ( $p=0.05$ ) lo cual demuestra que la asociación es real y que por lo tanto el DR2 es un marcador genético involucrado en la susceptibilidad a la enfermedad. El DR2 también es un factor de predisposición en Indúes (57, 58), e Indonecios (67); en la lepra lepromatosa (24) y en algunos grupos étnicos en la lepra tuberculoide (44). En el locus HLA-DP no se observó ninguna asociación ya que sólo se utilizan tres anticuerpos monoclonales (DP3, DP2,4 y DP5), con los cuales no se puede conocer la distribución de antígenos de la región DP. Algo que nunca se había estudiado es la correlación con los distintos polos de la TBP y de estos datos se desprende que a medida que la enfermedad es más severa, la asociación con el DR2 es más intensa ya que el riesgo relativo para desarrollar la enfermedad es de 2.5 en los pacientes totales; 2.1 en los RI; 2.8 en los UI y 3.4 en los UU (cuadro 16), sugiriendo que el gen HLA determina no sólo la expresión de la TB sino la severidad de la infección. Como no se observa ninguna asociación evidente con los subtipos DR15 o DR16 esto significa que los epítopes conservados en los subtipos del DR2, que están compartidos en ambos son las secuencias de susceptibilidad y no los residuos polimórficos que determinan a DR15 o DR16.

Se incluyó en el análisis al DQ1 ya que el DR2 está en desequilibrio de enlace con este antígeno para confirmar si la susceptibilidad radica en DR o en DQ. Como se ve en el cuadro 16 la contribución del DQ1 es marginal, ya que sólo aparece en los totales ( $\chi^2 = 4.11$ ;  $p=0.02$ ) pero la significancia se pierde al corregir la  $p$ , porque la asociación es muy débil. Esto confirma que la susceptibilidad radica en la región HLA-DR.

Un hallazgo muy interesante fue la presencia de un posible gen de protección asociado al DR11, éste se encontró muy significativamente disminuido en los pacientes (cuadro 13); 5% en los pacientes vs 21% es sanos. La disminución es franca ( $X^2 = 12.78$ ,  $p = 0.0003$ ;  $pc = 0.004$ ) y muestra con toda claridad que la ausencia del DR11 se agudiza en los subgrupos, en los RI la  $X^2 = 5.09$ ,  $p = 0.02$ , en los UI la  $X^2 = 6.19$ ,  $p = 0.01$  y en los UU es  $X^2 = 6.68$ ,  $p = 0.009$ ,  $pc = 0.05$ . En un trabajo previo en Coreanos (66, 67) se sugirió que el DR5, el antígeno público DR11, también están involucrados en la protección al padecimiento.

En un intento de conocer cuanto de la enfermedad se debe a los factores genéticos de susceptibilidad o resistencia ligados al MHC, se analizó la FE para el DR2 y la FP para el DR11 y se demostró que se debe parcialmente a un gen de clase II ligado al DR2 dado que la FE se va intensificando con la severidad del padecimiento (cuadro 17), solamente el 18% de la enfermedad se debe al gen HLA en los RI, pero la contribución genética es del 31% en los UU. La resistencia está intensamente ligada al MHC ya que la contribución es del 24% en los pacientes totales y va aumentando de 15% en RI; 17% en UI a 100% en los UU (cuadro 17).

Estos datos indican que la susceptibilidad depende en parte de los genes clase II, y que un individuo que es DR11, si es que llega a desarrollar TBP probablemente nunca manifestará la forma UU, de modo que aunque no es lo único que determina la protección si parece ser el factor determinante para evitar la forma severa.

Por último, se pudo evaluar si la capacidad de respuesta individual al PPD está localizada dentro del MHC. Como es bien sabido los gens Ir e Is radican en la región de clase II (50) y

sus productos son los antígenos DR y DQ. La capacidad para que un individuo se enfrente y maneje adecuadamente a un agente infeccioso depende en parte del perfil genético del MHC que porta el sujeto. Así, cuando se tienen los genes adecuados para determinado patógeno, aunque haya enfrentamiento a él no habrá enfermedad. Los genes Ir han sido descritos para lepra por Gorodezky y col (24), por de Vries y col. (54) y por Sasasaki y col. (52). En la TBP los resultados del presente estudio demuestran que la región DR está muy relacionada con la anergia al PPD, en el cuadro 18 se indica que el 55.9% de los anérgicos son DR2+, mientras que sólo el 28.6% de los PPD+ son portadores de dicho antígeno. La  $p=0.009$  (*in vivo*) y  $p=0.004$  (*in vitro*) indican que hay un gen Is ligado al DR2 que condicionan la falla en la capacidad de respuesta al PPD, es decir, el mismo gen que condiciona la susceptibilidad a la enfermedad.

La presencia de genes Ir en la TBP se ha demostrado utilizando péptidos purificados de M. tuberculosis. Así, se mostró que existe una fuerte asociación entre el DR2 y un alto título de anticuerpos para un épitope de una proteína de 38KDa de M. tuberculosis, indicando que el mecanismo de la asociación es la presencia de un gen Ir que regula la respuesta inmunológica en contra del antígeno de 38KDa. Esta respuesta patogénica se asocia con la presencia de esputos positivos (67).

Diversos estudios han señalado resultados equivalentes. La proteína de 19KDa tiene una secuencia característica que está restringida por DR1, de modo que los linfocitos T de los sujetos DR1 responden bien a este péptido. El DR4 también se ha asociado a una respuesta inmunológica elevada contra los antígenos de M.

tuberculosis pero no contra los de otras micobacterias. La regulación de la respuesta inmunológica por el DR4 puede ser relevante en la patogenia de la artritis reumatoide ya que se ha sugerido que los antígenos de M. tuberculosis juegan un papel relevante en la inducción de artritis autoinmune y no hay que olvidar que el DR4 es un marcador en la artritis reumatoide del adulto (80). Finalmente es importante hacer notar que la proteína de 65KDa comparte secuencias con la lactoferrina y la transferrina. Cuatro de éstas (KDLL) también están presentes en las moléculas DR1, DR3 y DR4, por lo que el mimetismo molecular entre estas proteínas y los antígenos HLA podrían constituir la base molecular de la autoinmunidad dependiente de las células T que se asocia a las micobacterias (79, 83). La proteína de 65KDa también parece despertar la actividad de los genes Ir, ya que éstos han desarrollado clones de linfocitos T que sólo responden a los aminoácidos 2-12 cuando la célula es DR3. El diseño de vacunas sintéticas tendrá que estar basado en la presencia de estos genes Ir, tomando en consideración cuales secuencias de los péptidos de M. tuberculosis son las más fuertemente inductoras de una respuesta celular protectora en presencia de secuencias HLA.

En resumen, la identificación temprana de individuos en riesgo ahora será posible con la descripción de los genes de susceptibilidad y resistencia y con esto y el conocimiento de los genes Ir, se podrán diseñar vacunas sintéticas específicas para los individuos altamente respondedores y para los bajos respondedores para poder lograr en un futuro próximo, la erradicación de la tuberculosis pulmonar de nuestro planeta.

## X. CONCLUSIONES

1.- Del total de pacientes, el 56% pertenecen al polo severo de la enfermedad, en donde el 38% son no-reactores intermedios (UI) y el 18% son no-reactores (UU). No existe predominio de edades ni de sexo, aunque hay una tendencia en los UU al sexo femenino (61.1%), mientras que el 66.7% de los RI son hombres. La enfermedad no muestra agregación familiar. Radiológicamente el grupo UU muestra las lesiones pulmonares más severas.

2.- La respuesta celular tanto in vivo como in vitro muestra anergia total en el polo no-reactor (UU), 71.4% y 78.4% en los UI y RI respectivamente, y una respuesta de un 100% en los RR. La respuesta celular específica es también elevada en la población aparentemente sana (75% responden al PPD cutáneo y el 80% in vitro). Esta respuesta va desde negativa en los UU hasta positiva en los RR, demostrando la inmunosupresión en el polo severo de la enfermedad.

3.- No existe una asociación con los antígenos de clase I. La susceptibilidad a la tuberculosis pulmonar depende del DR2 ( $X^2 = 7.17$ ,  $p = 0.004$ ,  $pc = 0.05$ ,  $RR = 2.5$ ). Se encontró un efecto de protección por el DR11 ( $pc = 0.004$ ,  $X^2 = 12.73$ ,  $p = 0.0003$ ,  $RR = 0.20$ ) y la ausencia de este antígeno es mayor en los grupos no-reactores.

4.- Por primera vez se analizó la correlación con los distintos polos de la TBP. A medida que la enfermedad es más severa la asociación va en aumento ya que el RR es de 2.5 en los pacientes totales, 2.1 en los RI, 2.8 en los UI y 3.4 en los UU, sugiriendo que el gen HLA determina no sólo la expresión de la TBP sino también la severidad de la infección.



5.- No existe asociación con los subtipos DR15 o DR16 lo cual significa que los epítopes conservados en el DR2 son las secuencias de susceptibilidad.

6.- Existe un posible gen de protección ligado a DR11, ya que este antígeno se encontró significativamente muy disminuido en los pacientes y su ausencia es más evidente en los los subgrupos UI ( $p=0.01$ ) y más en los UU ( $p=0.009$ ).

7.- La FE de 0.18 - 0.31 para el DR2 y la FP para el DR11 (0.15 - 1.00) demuestran que la enfermedad se debe parcialmente a un gen de clase II ligado a DR2 y que la protección depende del DR11. Estos hallazgos confirman que la resistencia y la susceptibilidad radican en la región HLA-DR.

8.- La falla en la capacidad de respuesta a el antígeno específico en la tuberculosis pulmonar depende de un gen ligado a DR2 que es el mismo gen condicionante de la susceptibilidad. Los individuos DR2+ son más susceptibles a infectarse con M. tuberculosis y probablemente tengan más riesgo a desarrollar la forma severa de la enfermedad.

## XI. BIBLIOGRAFIA

- 1.- SSA.- Informe Epidemiológico Anual.- 1982.- Boletín de la Dirección General de Epidemiología 4, México, 1982.
- 2.- Daniel Th. M.- (1980).- The immunology of tuberculosis.- Clin Chest Med.- 1: 189 - 201.
- 3.- Stead W W y Bates J.- (1986).- Tuberculosis.- En: Principios de medicina interna.- 6a Ed: Harrison S. McGraw-Hill México D.,F.- pp 1420 - 1434.
- 4.- Draper F, Ratledge C.- (1982).- The biology of tuberculosis, physiology, identification and classification.- Ed: Ratledge C y Stanford.- Vol 1 Academic Press INC. Londres.- pp 1 - 86.
- 5.- Grange JM.- (1980).- Mycobacterial diseases.- Ed: Arnot E, Londres.- pp 1 - 45, 67 - 78.
- 6.- SSA.- (1990).- Boletín Mensual de Epidemiología. 5; México D.,F.
- 7.- Pacheco C R, Vázquez R V y Badetlo N.- (1992).- Vacuna del Bacilo de Calmette y Guérin (BCG).- En: Vacunas Ciencia y Salud Ed: Escobar G A, Valdespino GJL y Sepúlveda AJ; SSA, Méx.D.,F. pp 187 - 201.
- 8.- Farga V.- (1992).- Inmunidad y tuberculosis.- En: Tuberculosis.- Ed: Farga V.- Publicaciones Técnicas Mediterráneo, Santiago de Chile.- pp 27 - 41.
- 9.- Soderman JR y William A.- (1978).- Tuberculosis En: Fisiopatología.- Ed. Soderman JR y William A 5a Ed.- Interamericana México DF. pp 390 -392.
- 10.- Lienzini L, Rottoli P y Rottoli L. (1977).- The spectrum of human tuberculosis.- Clin. Exper. Immunol.- 27:230 - 237.
- 11.- Wiegshauss E, Balasubramanian V y Smith DW.- (1989).-

- Immunity to tuberculosis from the perspective of pathogenesis.-  
Infect. and Immun.-5: 3671 - 3676.
- 12.- McMurray DN, Bartow RA y Mintzer CL.- (1989).- Impact of protein malnutrition on exogenous reinfection with Mycobacterium tuberculosis.- Infect Immuni 57:1746 - 1749.
- 13.- Jawetz E, Melnick JL y Adelberg EA.- (1979).- Mycobacteria En: Manual de microbiología médica.- Ed: Jawetz E, Melnick JL y Adelberg EA 8a.- El manual moderno, México.- pp 232 - 235.
- 14.- Youmans GP.- (1979).- The morphology and metabolism of mycobacteria.- En: tuberculosis.- Ed: WB Saunders Company pp 46 - 53.
- 15.- Wolinsky E, Davis BD, Dulveco R, Eisen HN, Ginsberg HS, Wood WB y MC Carty M.- (1983).- Mycobacterium En : tratado de microbiología .- 2a.- Ed: Wolinsky E, Salvat Editores, S.A. México D.,F. pp 868 - 884.
- 16.- Drutz DJ y Graybill JR.- (1988).- Enfermedades infecciosas En:Inmunología Básica y clínica.- 6a Ed. Stites DP, Stobo JD y Wells JV.- El manual moderno S.A. de C.V., México D.F. pp 561-564
- 17.- Al-T NG y Thewaini AJ.- (1978).- Study of Immunological status of patients with pulmonary tuberculosis.- Scand J. Immunol.- 8: 333 - 338.
- 18.- Ellner J L.- (1986).- La inmunidad en la tuberculosis: regreso a lo básico.- JAMA.- 256: 3324 - 3325.
- 19.- Ellner L y Wallis Rs.- (1989).- Immunologic aspects of mycobacterial infections.- Rev. Infect. Dis. 11: 455 - 458.
- 20.- Glassroth J, Robins AG y Snider DE.- (1980).- Tuberculosis in the 1980s.- Med. Prog. 302: 1441 - 1450.
- 21.- Bona C, Audibert F e Ivy D.- (1976).- Cell suppression in

- PPD induced blast specific response of human peripheral blood lymphocytes.- Clin. Exp. Immunol.- 26: 258 - 266.
- 22.- Schawartz ED.- (1988).- El complejo principal de Histocompatibilidad En: Inmunología Básica y Clínica.- 6a- Ed: Stites DP, Stobo JD y Wells JV.- El Manual Moderno S.A. de C.V. México D.,F. pp 46 - 58.
- 23.- Bodmer WF.- (1989).- HLA 1989 En: Immunobiology of HLA Ed: Dupont, B. Springer-Verlag. Nueva York, Vol II. pp 1 - 9.
- 24.- Gorodezky L C.- (1989).- Genes de susceptibilidad y supresión inmunológica ligados al MHC en la lepra.- Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN México D.F., Tesis Doctoral.
- 25.- Klein J.- (1991).- Of HLA, Tryps, and Selection: An Essay on Coevolution of MHC and Parasites.- Hum Immunol.-30:247 - 258.
- 26.- Strachan T.- (1987).- Molecular genetics and polimorphism of Class I HLA antigens.- Brit. Med. Bull.- 43:1 - 14.
- 27.- Gorodezky C.- (1993).- La inmunogenética en las enfermedades reumáticas.- En: Reumatología Pediátrica.- Ed: Rodriguez R. Mc Graw Hill, México (en prensa).
- 28.- Strominger JL.- (1987).- Structure of Class I and Class II HLA antigens.- Brit. Med. Bull. 43:81 - 93.
- 29.- Orr HT (1989).- HLA Class I gene family: Characterization of genes encoding no-HLA-A,B,C proteins En: Immunobiology of HLA Ed: Dupont Bo. Springer-Verlag.- Nueva York, Vol II. pp 33 - 49.
- 30.- Trowsdale J. Ragoussis J y Campell RD.- (1991).- Map of the human M H C.- Immunol Today.-12: 443 - 446.
- 31.- White PC.- (1989).- Molecular genetics of the clases III region of the HLA complex En: Immunobiology of HLA Ed: B. Dupont

- Bo Springer-Verlag.- Nueva York, Vol II. pp 62 - 69.
- 32.- DeNagel DC y Pierce SK.- (1991).- Heat shock proteins and immune responses: An Early View Immunol. Res.- 10: 66 - 78.
- 33.- Roitt I, Brostoff J y Male D.- (1986).- Major Histocompatibility Complex.- En:Immunology Ed: Roitt I, Brostoff J y Male D.- The C.V. Mosby Company, Gower Medical Publishing. Toronto. pp 4.1 - 4.8
- 34.- Bjorkman PJ., Saper MA., Samraovi B, Bennett WS, Strominger JL y Wiley DC.- (1987).- structure of the human class I histocompatibility antigens, HLA-2.- Nature 329:506 - 512.
- 35.- Parham P, Lawlor DA, Salter RD, Lomen CE, Bjorkman PJ y Ennis PD.- (1989).- HLA-A,B,C: Patterns of polymorphism in Peptide-Binding proteins En: Immunobiology of HLA Ed: B. Dupont Springer-Verlag, Nueva York Vol II.- pp 10 - 33.
- 36.- Bell IJ, Todd JA y McDevit HO.- (1989).-Molecular structure of human class II antigens En: Immunobiology of HLA Ed: B. Dupont Springer-Verlag, Nueva York Vol II 40 - 49.
- 37.- Mach B, Gorski J, Rollini P, Berte C, Amaldi I, Berdoz J y Ucla C.- (1986).- Polymorphism and regulation of HLA class II genes of the major histocompatibility complex.- Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology Vol LI 67 - 74.
- 38.- Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GTMH, Strominger JL, Svejgaard A y Terasaki PI.- (1992).- Nomenclature for factors of the HLA system, 1991.- Tissue Antigens.- 39:161 - 173.
- 39.- DeNagel DC y Pierce SK.- (1992).- A case for chaperones in antigen processing.- Immunol. Today 13: 86 - 88.

- 40.- Beatty PG, Mickelson EW, Petersdorf, Choo Y y Geraghty DE.- (1991).- Histocompatibility 1991.- Transfusion 31: 847 - 856.
- 41.- Tiwari JL y Terasaki PI.- (1985).- HLA and diseases asosiations.- Ed: Tiwari JL y Terasaki PI, Springer-Verlag, Nueva York, EU.- pp 1 - 48.
- 42.- Gorodezky C, Nájera, Rangel BE, Castro LE, Flores J, Velázquez G, Granados J y Sotelo J.- (1986).- Immunogenetic profile of multiple sclerosis in mexicans .- Human Immunol.- 16: 364 - 375.
- 43.- Gorodezky C, Varela B, Castro LE, Chávez A, Escobar A y Martínez J.- (1983).- HLA-DR antigens in Mexicans patients with Guillain -Barré Syndrome.- J. Neuroimmunol.- 4: 1.
- 44.- Gorodezky C, Flores J, Arevalo N, Castro LE, Silvia A y Rodríguez O.- (1987).- Tuberculoid leprosy in Mexicans is associated with HLA-DR3.- Lepr. Rev. 58: 401 - 406.
- 45.- Del Brutto OH, Granados G, Talamas O, Sotelo J y Gorodezky C.- (1991).- Genetic Pattern of the HLA System: HLA- A, B, C, DR and DQ Antigens in Mexican Patients with Parenchymal Brain Cysticercosis.- Hum Biol.- 63: 85 - 93.
- 46.- Hors J.- (1989).- H L A et maladies.- En: H L A complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme.- Ed: Dausset J y Pla M.- Médecine-Sciences Flammarion, Paris, Francia. pp 299 - 316.
- 47.- Braciale TJ y Braciale VL.- (1991).- Antigen presentation: structural themes and functional variations.- Immunol. Today 12: 124 - 129.
- 48.- Nagy ZA, Lehmann PV, Falcioni F, Muller S y Adorini L.- (1989).- Why peptide their possible role in the evolution of MHC-restricted T-cell recognition.- Immunol. today.- 10: 132 - 137.

- 49.- Svejgaard A y Ryder LP.- (1979).- Disease Associations.- En: Histocompatibility techniques.- Ed: HM, Dick y F. Kissmeyer-Nielsen. Elsevier/North Holland. Amsterdam.- pp 185 - 205.
- 50.- De Vries RRP, Ottenhoff THM y van Schooten WCA.- (1988).- Human Leukocyte Antigens (HLA) and Mycobacterial Disease.- Springer Semin Immunopathol.- 10: 305 - 318.
- 51.- Germain RN y Malisen B.- (1986).- Analysis of the expresion and function of class II Major Histocompatibility Complex encoded Molecules by DNA mediated gene trasfer.- Am. Rev. Immunol.- pp 281 - 315.
- 52.- Hirayama K, Matsushita S, Kikuchi J, Luchi M, Ohta N y Sasasaki T.- (1987).- HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response to schistosomal antigen in humans.- Nature.- 327: 426 - 429.
- 53.- Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronek Z, Jacob ChO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, Steinman L y McDevitt HO.- (1988).- A Molecular Basis for M H C Class II- Associated Autoimmunity.- Science 240: 1003 - 1009.
- 54.- De Vries RRP.- (1989).- Regulation of T cell responsiveness against Mycobacterial antigens by HLA Class 2 immune response genes.- Rev. of Inf. Dis. 11:S400 - S403.
- 55.- Escobar GA, Gorodezky C y Salazar-Mallén.- (1973).- Distribution of some of the HLA-A system lymphocyte antigens in Mexicans : II Studies in atopics and in lepers.- Vox Sang. 25: 151 - 155.
- 56.- De Vries RRP, Mehra NK, Vaidaya MC, Gupte MD, Khan PM y Van Rood JJ.- (1980).- HLA- Linked control of susceptibility to tuberculoid leprosy and association with HLA-DR types.- Tissue

Antigens 16:294-304.

57.- Singh SPN, Mehra NK y Dingley HB.- (1983).- HLA-A,B,C and DR antigen profile in pulmonary tuberculosis in north India.- Tissue Antigens 21: 380 - 384.

58.- Mehra NK y Bovornkitt S.- (1986).- HLA and tuberculosis A-Reappraisal.- Asian Pacific J. Allerg. Immunol. 4: 149 - 156.

59.- Al-Arif LI, Goldstein RA, Arronti LE y Janicki BW.- (1979).- HLA Bw15 and tuberculosis in North American Black population.- Am. Rev.Respir.Dis.- 120: 1275 - 1278.

60.- Cox AR, Arnold RD, Cook D y Lundberg D.- (1982).- HLA phenotypes in mexicans - americans with tuberculosis.- Am.Rev. Respir. Dis. 126: 653 - 665.

61.- Singh SPN, Mehra NK, Dingley HB, Pande JN y Vaidya MC.- (1984).- HLA haplotype segregation study in multiple case families of pulmonary tuberculosis.- Tissue Antigens 23: 84 - 86

62.- Xu X, Li S, Wang C y Li QH.- (1986).- Study on the association of HLA with pulmonary tuberculosis.- Immunol. Invest. 15:327 - 332.

63.- Zervas J, Constantopoulos C, Toubis M, Anagnostopoulos D y Cotsovoulou V.- (1987).- H L A-A and B antigens and pulmonary tuberculosis in Greeks.- Br. J. Dis. Chest.- 81: 147 - 149.

64.- Singh SPN, Mehra NK, Dingley HB, Pande JN y Vaidya MC.- (1983).- Human leukocyte antigen (HLA)-Linked control of susceptibility to pulmonary tuberculosis and association with HLA-DR types.- J. Inf. Dis. 148:676 - 681.

65.- Mehra NK, Taneja V, Chaudhuri TK, Kailash S, Bin AJ, Chang SX, Hawkins BR y Pitchappan RM.- (1986).- Pulmonary tuberculosis: Joint Report.- En: Proceedigns of the third Asia and Oceania



Histocompatibility Workshop Conference.- Ed. Aizawa, M., Hokkaido University Press. Sapporo.- pp 374 - 379.

66.- Chung TH, Jung TH, Kim JC, Lee IS, Han H y Park MS.- (1986) HLA antigens in Korean patients with tuberculosis.- En: The Proceedings of the third Asia - Oceania Histocompatibility Workshop Conference.- Ed: Aizawa M., Hokkaido University Press Sapporo, Japon.- pp 644 - 648.

67.- Bothamley GH, Beck SJ, Schreuder GMT, Amaro JD, De Vries RRP, Kardjito T, e Ivanyi J.- (1989).- Association of tuberculosis and M. tuberculosis. Specific antibody levels with HLA.- Infec. Dis. 159: 549 - 555.

68.- Jiang ZF, An JB, Sun YP, MittalKK y Lee TD.- (1983).- Association of HLA-Bw35 with tuberculosis in the Chinese.- Tissue Antigens 22: 86 - 88.

69.- Sun YP, An JB, Jiang ZF, Dai CQ, Li C y Chen W.- (1989).- H L A and Tuberculosis in Chinese patients.- Immunobiology of H L A Ed: B. Dupont. Springer-Verlag, Nueva York Vol II pp 466 - 467.

70.- Hawkins BR, Higgins DA, Chan SL, Lowrie DB, Mitchison DA y Girling DJ.- (1988).- HLA Typing in the Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council Study of Factors Associated with the Breakdown to Active Tuberculosis of Inactive Pulmonary Lesions.- Am. Rev. Respir. Dis. 138: 1616 - 1621.

71.- Cox JH, Bruce CK y Juraj I.- (1989).- Mechanisms of recrudescence of Mycobacterium bovis BCG infection in mice.- Infect. Immun. 57 : 1719 - 1724.

72.- Bartow AR y McMurray ND.- (1989).- Vaccination with Micobacterium bovis BCG affects the distribution of Fc receptor

bearing T lymphocytes in experimental pulmonary tuberculosis.-  
Infec. Immun.- 57: 1374 - 1379.

73.- Smith JA y Reichman LB.- (1972).- Lymphocyte transformation-  
An aid in the diagnosis of tuberculosis in patients with  
nonreactive skin tests.- Am.Rev.Resp.Dis. 106: 194 - 206.

74.- Gorodezky C, Carranza JM, Hernández MO, De la Rosa LG y  
Mayen PE.- (1990).- Manual de Prácticas de Histocompatibilidad:  
Departamento de Inmunogenética, INDRE, SSA.

75.- Haldane, JBS (1955). The estimation and significance of the  
logarithm of a ratio of frequencies. Ann. Hum. Genet. 20: 309-311

76.- Woolf B.- (1955).- On estimating the relation between blood  
groups and disease.- Ann. Hum. Genet. 19: 251 - 253.

77.- Bengtsson BO y Thomson G.- (1981).- Measuring the strength  
of associations between HLA antigens and Diseases.- Tissue  
Antigens.- 1981 17: 356 - 363.

78.- Busson M, Prevost P, Degos L.- (1989).- Statistique et  
génétique.- En: HLA complex majeur distocompatibilite' de  
l'homme.- Ed: Dausset I y Pla M.- Médecine-Sciences Flammarion,  
Paris. pp 447 - 465.

79.- Bahr GM, Rook GAW, Al-Saffar M, Van Embden J, Stanford JL y  
Behbehani K.- (1989).- Antibody levels to micobacteria in  
relation to HLA type: evidence for non-HLA-linked high levels of  
antibody to the 65 KD heat shock protein of M. bovis in  
rheumatoid arthritis.- Clin. Exp. Immunol. 74: 211 - 215.

80.- Ottenhoff THM, Torres P, De las Aguas JT, Fernández R, Van  
Eden W, de Vries RRP y Stanford JI.- (1986).- Evidence for an  
HLA-DR4 associated immune-response gene for Mycobacterium  
tuberculosis.- Lancet: I: 310 - 312.

81.- Van Schoten WCA, Elferink DG, Van Embden J, Anderson DC y de Vries RRP.- (1989).- DR3-restricted T cells from different HLA-DR3-positive individuals recognize the some peptide (amino acids 2-12) of the mycobacterial 65KDa heat-shock protein.- Eur. J. Immunol. 19: 2075 - 2079.

82.- Rea TH y Terasaki P.- (1980).- HLA-DR antigens in tuberculoid and lepromatous leprosy.- Lepr. Rev. 51: 117 - 123.

83.- Aguas AP, Esaguy N, Sunkel CE y Silva MT.- (1990).- Cross-reactivity and sequence homology between the 65-kilodalton Mycobacterial heat shock protein and human lactoferrin, transferrin and DRB subsets of Major Histocompatibility Complex Class II molecules.- Infect Immun 58: 1461 - 1470.